



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Caminos,
Canales y Puertos

Evaluación del potencial biofertilizante y bioestimulante de
biomasa de microalgas cultivadas en agua residual urbana.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Ambiental

AUTOR/A: Sanchez Cabral, Keila Priscila

Tutor/a: Pachés Giner, María Aguas Vivas

Cotutor/a externo: González Camejo, Josué

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

 Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria **ETSE-UV**

CAMINOS
UPV ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AMBIENTAL



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE Y BIOESTIMULANTE DE BIOMASA DE MICROALGAS CULTIVADAS EN AGUA RESIDUAL URBANA.

AUTOR/A:

KEILA PRISCILA SANCHEZ CABRAL

TUTOR/A/S/AS:

MARÍA AV PACHÉS GINER

JOSUÉ GONZÁLEZ CAMEJO

JULIO, 2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han brindado su apoyo y dedicación durante la realización de este trabajo.

En primer lugar, quisiera agradecer sinceramente a mis tutores:

Dra. María Pachés Giner, gracias por confiar en mí, gracias por motivarme a dar lo mejor en cada avance, por enseñarme e incentivar mi sentido del saber. Me han inspirado a querer aprender cada día más y a entender que en todo problema de ingeniería siempre hay más de una opción para resolverlo. Me han enseñado que es mi trabajo, como ingeniero, buscar la mejor solución.

Dr. Josué Gonzales Camejo, gracias por darme un voto de confianza y aceptar ser parte de este proyecto, por disponer de su tiempo, conocimiento y recursos para obtener los resultados esperados. Gracias por estar siempre disponible y por seguirme en cada paso que daba.

Agradezco también a todos los miembros de los laboratorios del IIAMA y de la ETSE, quienes me han recibido con los brazos abiertos y han estado siempre dispuestos a tenderme una mano cuando lo he necesitado.

A mis profesores y compañeros de estudios, por enseñarme el valor de la responsabilidad y el trabajo en equipo, además de acompañarme en esta travesía y proporcionarme los elementos académicos necesarios para lograr mis objetivos.

Mi más sincero agradecimiento también a mi familia y amigos, cuyo constante apoyo y preocupación por el progreso de este trabajo han sido una fuente inagotable de motivación. Gracias por acompañarme y ayudarme en todos los aspectos de mi vida, y por ser un pilar fundamental durante todo este proceso.

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración y apoyo de todos vosotros. A cada uno de ustedes,

Gracias.

RESUMEN

El tratamiento de aguas residuales con microalgas representa una solución innovadora y sostenible para abordar los desafíos ambientales y la escasez de recursos naturales, especialmente en países como España. Esta práctica no solo contribuye a la eliminación de nutrientes como el nitrógeno (N) y el fósforo (P) del agua, reduciendo así la contaminación y mitigando la eutrofización de cuerpos de agua, sino que también convierte estos nutrientes en biomasa útil que puede ser reutilizada como biofertilizante en la agricultura. El cultivo de microalgas en sistemas de tratamiento de aguas residuales promueve la economía circular al reutilizar recursos dentro del sistema agrícola, proporcionando una alternativa sostenible y económica a los fertilizantes químicos convencionales.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la eficacia bioestimulante y biofertilizante de biomasa cultivada en agua residual urbana en cultivos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). La biomasa microalgal predominante, principalmente compuesta por *Scenedesmu*, presentó una composición de 10,83% de peso seco y concentraciones de nutrientes de 2,87% de N y 0,37% de P.

La investigación se dividió en dos fases: una utilizando suelo normalizado (SPHAGNUM), y otra con suelo natural. Se compararon cuatro tratamientos: Control (Blanco), Biofertilizante congelado, Biofertilizante sonicado y Biofertilizante liofilizado.

Los resultados demostraron que en condiciones ideales de cultivo (suelo normalizado), los tratamientos biofertilizantes mostraron mejoras significativas en parámetros de crecimiento como longitud y grosor del tallo, número de hojas, peso fresco y seco del brote, en comparación con el tratamiento de control.

El estudio destacó el potencial bioestimulante del tratamiento sonicado, independientemente del sustrato. No obstante, se identificaron limitaciones relacionadas con la variabilidad ambiental y la falta de análisis exhaustivos de parámetros de calidad del suelo y microbiota.

Se recomienda realizar más estudios a largo plazo y análisis detallados de la dinámica de nutrientes para profundizar en la comprensión de los efectos del biofertilizante/bioestimulante en diferentes condiciones ambientales y etapas de desarrollo vegetal.

En resumen, este estudio sugiere que el uso de biomasa microalgal derivada del tratamiento de aguas residuales urbanas puede ser efectivo como biofertilizante para los cultivos de albahaca. Estos hallazgos respaldan la viabilidad de utilizar microalgas como parte de estrategias sostenibles en la depuración de aguas, subrayando la necesidad de futuras investigaciones para optimizar su aplicación y evaluar su impacto a largo plazo en la bioeconomía circular.

Palabras claves: Microalgas, Biofertilizante, Masa algal, Nutrientes, Economía Circular, Recirculación de Nutrientes.

ABSTRACT

Wastewater treatment using microalgae represents an innovative and sustainable solution to address environmental challenges and natural resource limitations, especially in countries like Spain. This practice not only helps remove nutrients such as nitrogen (N) and phosphorus (P) from water, thereby reducing pollution and mitigating water eutrophication, but also converts these nutrients into valuable biomass that can be reused as biofertilizer in agriculture. Cultivating microalgae in wastewater treatment systems promotes circular economy principles by recycling resources within the agricultural system, providing a sustainable and cost-effective alternative to conventional chemical fertilizers.

This study aimed to evaluate the bio-stimulating and biofertilizing efficacy of biomass cultivated in urban wastewater on basil (*Ocimum basilicum* L.) crops. The predominant microalgal biomass, mainly composed of *Scenedesmus*, exhibited a composition of 10.83% dry weight and nutrient concentrations of 2.87% N and 0.37% P.

The research was divided into two phases: one using standardized soil (SPHAGNUM) and the other with natural soil. Four treatments were compared: Control (Blank), Frozen Biofertilizer, Sonicated Biofertilizer, and Lyophilized Biofertilizer.

Results demonstrated that under ideal cultivation conditions (standardized soil), biofertilizer treatments showed significant improvements in growth parameters such as stem length, stem thickness, number of leaves, and fresh and dry weight of shoots compared to the control treatment.

The study highlighted the bio-stimulating potential of the sonicated treatment, regardless of the substrate. However, limitations related to environmental variability and the lack of comprehensive analysis of soil quality parameters and microbiota were identified.

Further long-term studies and detailed analyses of nutrient dynamics are recommended to deepen understanding of the effects of biofertilizer/bio-stimulant under different environmental conditions and stages of plant development.

In summary, this study suggests that microalgal biomass derived from urban wastewater treatment can effectively serve as a biofertilizer for basil crops. These findings support the viability of using microalgae as part of sustainable strategies in water purification, emphasizing the need for future research to optimize its application and assess its long-term impact on circular bioeconomy.

Keywords: Microalgae, Biofertilizer, Algal biomass, Nutrients, Circular Economy, Nutrient Recirculation.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	10
1.1.	Situación Actual en España de la Demanda del Nitrógeno y Fósforo en el Suelo para la Agricultura	11
1.2.	Demanda de Fertilizante como Fuente de Nutrientes en la Agricultura en España 11	
1.3.	Tratamientos de Aguas Residuales con Microalgas.....	12
1.4.	Tipos de Residuos Provenientes del Tratamiento con Microalgas	12
1.5.	Clasificación de los bioestimulantes.....	15
1.6.	Bioestimulantes y Tolerancia al Estrés Abiótico	17
1.7.	Características comunes de los bioestimulantes.....	18
1.8.	Normativa	20
2.	OBJETIVOS	24
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.	Diseño de experimento:.....	25
3.2.	Biomasa de microalgas.....	26
3.3.	Tratamientos de la biomasa	27
3.3.1.	Centrifugado	27
3.3.2.	Tratamiento 1. Congelado:.....	28
3.3.3.	Tratamiento 2. Homogeneización mecánica (Sonicado):	28
3.3.4.	Tratamiento 3: Liofilización:	28
3.4.	Caracterización del suelo	29
3.5.	Medidas analíticas y métodos	29
3.5.1.	Ensayos en plantas:	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1.	Caracterización y dosificación del biofertilizante	31
4.2.	Efectos en la germinación	32
4.3.	Efectos de la fertilización en el crecimiento de las plantas	34
4.3.1.	Análisis de las variables observadas durante el tiempo de experimento. 34	
4.3.2.	Variables al final del experimento.....	36
4.3.2.1.	Análisis de variables físicas.....	36
4.3.2.2.	Análisis de contenido de clorofila.....	41
4.3.2.3.	Análisis de contenido de nutrientes.....	42
4.4.	Comparación de cultivos. Fase 1 vs Fase 2.....	44

5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	49
5.1.	Limitaciones y futuros estudios.....	49
6.	REFERENCIAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Imagen 1. Esquema resumen introducción.....	10
Imagen 2. Movimientos de nutrientes en el suelo.....	11
Imagen 3. Subproductos del desecho de las microalgas.....	13
Imagen 4. Tipos de bioestimulantes y sus funciones más importantes	15
Imagen 5. Tipos de estrés y sus efectos	17
Imagen 6. Esquema de plantación	26
Imagen 7. Imágenes del cultivo	27
Imagen 8. Esquema de fotobiorreactores.....	27
Imagen 9. Centrifugadora ThermoFisher Scientific.....	27
Imagen 10. Ultra Turax T 25.....	28
Imagen 11. Suelo	29
Imagen 12. Suelo	29
Imagen 13. Biofertilizante.....	31
Imagen 14. Aspecto visual dosificación. Fase 1.....	32
Imagen 15. Gráfica tasa de crecimiento. Fase 1 (SPHAGNUM) y Fase 2 (Suelo real).	32
Imagen 16. Visualización de todos los brotes germinados. Fase 1 . Dia 20 de observación.	33
Imagen 17. Visualización de todos los brotes germinados. Fase 2. Dia 17 de observación	33
Imagen 18. Comparativa visual brote por tratamiento. Fase 1.....	34
Imagen 19. Gráfico de tendencia de crecimiento de plantas. Fase 1.....	34
Imagen 20. Comparativa visual brote por tratamiento. Fase 2.....	35
Imagen 21. Gráfico de tendencia de crecimiento de plantas. Fase 2.....	35
Imagen 22. Imágenes del cultivo de los diferentes tratamientos por replicas. Fase 1. Siguiendo esquema imagen 10.	36
Imagen 23. Longitud raíces (A), longitud de tallo (B), longitud largo de hojas (C), longitud ancho de hojas (D), número de hojas (E), grosor de tallo (F), % de agua de las plantas (G), peso fresco (H) y peso seco (I) (n = 24) de plantas de albahaca cultivadas en SPHAGNUM con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonificado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey.....	37
Imagen 24. Imágenes del cultivo de los diferentes tratamientos por replicas. Fase 2. Siguiendo esquema imagen 10.	38
Imagen 25.. Longitud raíces (A), longitud de tallo (B), longitud largo de hojas (C), longitud ancho de hojas (D), número de hojas (E), grosor de tallo (F), % de agua de la planta (G), peso fresco (H) y peso seco (I) (n = 23) de plantas de albahaca cultivadas en Suelo con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonificado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey.....	39
Imagen 26. Contenido de clorofila (n = 12) de plantas de albahaca cultivadas en SPHAGNUM con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonificado y fertilizante liofilizado. Las barras de error	

corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey 41

Imagen 27. Contenido de clorofila (n = 24) de plantas de albahaca cultivadas en Suelo con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey..... 41

Imagen 28. Contenido de nitrógeno (A) y contenido de fosforo (B) (n = 12) de plantas de albahaca cultivadas en SPHAGNUM con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey..... 42

Imagen 29. Contenido de nitrógeno (A) y contenido de fosforo (B) (n = 15) de plantas de albahaca cultivadas en Suelo con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey..... 43

Imagen 30. Media y desviación estándar variables físicas. Fase 1. 44

Imagen 31. Media y desviación estándar variables físicas. Fase 2. 45

Imagen 32. Media y desviación estándar del clorofila. Fase 1 y Fase 2..... 46

Imagen 33. Media y desviación estándar del Nitrógeno y Fosforo. Fase 1 y Fase 2..... 47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límite de concentración de metales pesados en fertilizantes	22
Tabla 3. Resumen diseño de experimento	25
Tabla 2. Caracterización efluente.....	26
Tabla 4. Características del suelo	29
Tabla 5. Parámetros medidos durante tiempo de observación	29
Tabla 6. Parámetros medidos al final del tiempo de observación.....	30
Tabla 7. Caracterización del biofertilizante obtenido	31
Tabla 8. Dosificación de biofertilizante por maceta	32
Tabla 9. Datos de germinación. Fase 1.....	33
Tabla 10. Datos de germinación. Fase 2.....	33
Tabla 11. Fase 1 vs Fase2. Comparación de los diferentes tratamientos con respecto a los diferentes sustratos por variable física medida. p-Valor obtenido a través de la prueba t y d de cohen.	45
Tabla 12. Comparación de los diferentes tratamientos con respecto a los diferentes sustratos por nutriente analizado. Fase 1 vs Fase 2. p-Valor obtenido a través de la prueba t y d de cohen.	46
Tabla 13. Comparación de los diferentes tratamientos con respecto a los diferentes sustratos por nutriente analizado. Fase 1 vs Fase 2. p-Valor obtenido a través de la prueba t y d de cohen.	47

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de aguas residuales con microalgas se presenta como una solución innovadora y sostenible para abordar los desafíos medioambientales y las limitaciones en los recursos naturales, especialmente en países como España. La producción agrícola sostenible es esencial para satisfacer las crecientes demandas alimentarias de una población en expansión. En este contexto, la gestión eficaz de los nutrientes en el suelo, particularmente del nitrógeno (N) y el fósforo (P), es crucial no solo para aumentar la productividad agrícola, sino también para proteger el medio ambiente (Nair, K.P. , 2019).

La acumulación excesiva de nutrientes, como N y P, en cuerpos de agua debido al uso ineficiente de fertilizantes y al vertido de aguas residuales, contribuye a la eutrofización, un proceso que deteriora la calidad del agua y afecta negativamente a los ecosistemas acuáticos (Pandey, P.K. and Pande, A. , 2023). El tratamiento de aguas residuales mediante microalgas no solo ayuda a eliminar estos nutrientes del agua, reduciendo la contaminación, sino que también convierte estos elementos en biomasa útil que puede reutilizarse como fertilizante (Kumar, 2021).

Las microalgas son eficientes en la absorción de N y P, y su cultivo en sistemas de tratamiento de aguas residuales ofrece múltiples beneficios. Entre ellos, la reducción de la carga contaminante, la producción de biomasa valiosa y la mitigación de gases de efecto invernadero (Chisti, 2013). Esta biomasa algal puede ser utilizada como biofertilizante, mejorando la eficiencia en el uso de nutrientes y reduciendo la dependencia de fertilizantes químicos, lo que a su vez disminuye los costos y el impacto ambiental asociado a su producción y aplicación (Razzak et al., 2013).

Además, el uso de microalgas en el tratamiento de aguas residuales se alinea con los principios de la economía circular, al promover la reutilización y el reciclaje de recursos dentro del sistema agrícola (Macedonio, 2022). Esta práctica no solo contribuye a la sostenibilidad ambiental, sino que también ofrece beneficios económicos al transformar un desecho en un recurso valioso.

Al integrar estas prácticas, se establece una base sólida para un desarrollo agrícola sostenible y resiliente a largo plazo. La adopción de tecnologías de tratamiento de aguas residuales con microalgas representa un paso significativo hacia la optimización de los recursos naturales, la protección del medio ambiente y la mejora de la productividad agrícola (Markou & Georgakakis, 2011). En resumen, la utilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales no solo responde a una necesidad medioambiental urgente, sino que también ofrece una solución práctica y eficiente para los desafíos agrícolas contemporáneos.

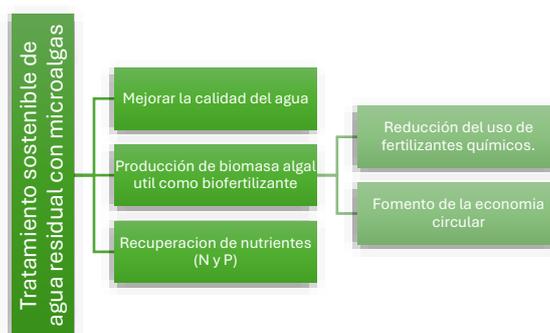


Imagen 1. Esquema resumen introducción

1.1. Situación Actual en España de la Demanda del Nitrógeno y Fósforo en el Suelo para la Agricultura

En España, la demanda de nutrientes en el suelo para la agricultura ha experimentado un aumento constante en las últimas décadas debido a varios factores. El incremento de la intensificación agrícola, la expansión de la superficie cultivada y el aumento de la demanda de alimentos han llevado a una mayor extracción de nutrientes del suelo. Además, los fenómenos climáticos extremos y el cambio climático están afectando la disponibilidad y la absorción de nutrientes por parte de los cultivos, lo que agrava aún más la situación. En 2011, en España, se observaron cifras significativas en cuanto a la extracción de nitrógeno y fósforo del suelo a través de la retirada de cosechas en varias comunidades autónomas. En la Comunidad Valenciana, estos porcentajes alcanzaron el 64% para el nitrógeno y el 85% para el fósforo. Por su parte, en Castilla-La Mancha, estos valores fueron del 75% para el nitrógeno y del 84% para el fósforo. En Aragón, las cifras correspondientes fueron del 75% para el nitrógeno y del 80% para el fósforo. Estos datos destacan la importancia en la extracción de nutrientes del suelo a través de la actividad agrícola. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2011)



Imagen 2. Movimientos de nutrientes en el suelo.

Este panorama plantea desafíos significativos para los agricultores y los responsables de la gestión agrícola, quienes deben encontrar formas de mantener un equilibrio adecuado de nutrientes en el suelo para garantizar la productividad de los cultivos y preservar la salud del medio ambiente.

1.2. Demanda de Fertilizante como Fuente de Nutrientes en la Agricultura en España

Ante la creciente demanda de nutrientes en el suelo, el uso de fertilizantes se ha vuelto omnipresente en la agricultura española. Los fertilizantes proporcionan una fuente concentrada y fácilmente disponible de nutrientes para los cultivos, lo que ayuda a compensar la pérdida de nutrientes del suelo y a satisfacer las necesidades de las plantas durante su ciclo de crecimiento. En el año 2011, en España, se registraron datos significativos en relación con la contribución de nitrógeno y fósforo al suelo mediante la aplicación de fertilizantes minerales en diversas comunidades autónomas. En la Comunidad Valenciana, se constató que el aporte de estos nutrientes alcanzó el 63% para el nitrógeno y el 62% para el fósforo. Por otro lado, en Castilla-La Mancha, se evidenció que estos índices fueron del 69% para el nitrógeno y del 64% para el fósforo. Asimismo, en Aragón, se observaron cifras correspondientes al 45% para

el nitrógeno y al 52% para el fósforo. Estas estadísticas resaltan la relevancia de estas regiones en términos de aporte de nutrientes al suelo mediante la aplicación de fertilizantes minerales durante dicho año. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2011)

Sin embargo, el uso indiscriminado de fertilizantes minerales puede tener consecuencias negativas, como la contaminación del suelo y los recursos hídricos, la eutrofización de los cuerpos de agua y la pérdida de biodiversidad. Por lo tanto, es esencial adoptar prácticas de fertilización responsables y sostenibles que minimicen los impactos ambientales y promuevan la salud del suelo a largo plazo. En este sentido, los fertilizantes orgánicos, provenientes de fuentes naturales como el compost o el estiércol, y los biofertilizantes derivados de microalgas, ofrecen una serie de ventajas sobre los fertilizantes minerales.

1.3. Tratamientos de Aguas Residuales con Microalgas

En los últimos años, se ha investigado ampliamente el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales. Estos organismos fotosintéticos microscópicos pueden absorber nutrientes, como nitrógeno y fósforo, de las aguas residuales, contribuyendo así a la purificación del agua. Este enfoque ofrece una alternativa sostenible y económica a los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales y puede generar subproductos útiles para la agricultura, como biofertilizantes.

Además de su capacidad para eliminar nutrientes, las microalgas también pueden remover contaminantes orgánicos e inorgánicos, incluyendo metales pesados y patógenos, mejorando significativamente la calidad del agua tratada. Este proceso biológico es impulsado por la fotosíntesis, donde las microalgas utilizan la luz solar para crecer y metabolizar los nutrientes presentes en el agua residual (Park et al., 2011).

La implementación de sistemas de tratamiento basados en microalgas puede integrarse en plantas de tratamiento de aguas residuales existentes, reduciendo así los costos operativos y el impacto ambiental asociado con los métodos tradicionales. Además, el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales contribuye a la mitigación de gases de efecto invernadero, ya que el proceso de fotosíntesis captura dióxido de carbono (CO₂) del aire (Zhou et al., 2014).

La biomasa algal resultante del proceso de tratamiento puede ser aprovechada de diversas maneras. Uno de los usos más prometedores es como biofertilizante, debido a su contenido rico en nutrientes esenciales para las plantas. Además, la biomasa algal puede ser utilizada en la producción de biocombustibles, ofreciendo una fuente de energía renovable y sostenible (Christenson & Sims, 2011).

1.4. Tipos de Residuos Provenientes del Tratamiento con Microalgas

El tratamiento de aguas residuales con microalgas puede generar varios tipos de residuos, incluyendo la biomasa residual de las propias microalgas, así como subproductos químicos y orgánicos resultantes del proceso de purificación del agua. Estos residuos pueden tener un potencial significativo para su reutilización en la agricultura como biofertilizantes y otros productos agrícolas.

Las microalgas han despertado un interés científico considerable en diversos ámbitos de investigación en tiempos recientes. A pesar de su tamaño diminuto, estos microorganismos

están entre las opciones alimenticias más nutritivas disponibles y contribuyen al bienestar general del cuerpo (Draaisma et al., 2013).

Además de su valor nutricional, las microalgas ofrecen una amplia gama de aplicaciones y productos (Spolaore et al., 2006). Históricamente, especies como *Nostoc*, *Spirulina* y *Aphanizomenon* se han utilizado como suplementos de proteínas y aditivos alimentarios. En la industria cosmética, los extractos derivados de *Arthrospira* y *Chlorella* se incorporan en cremas antienvjecimiento debido a su capacidad para mejorar la elasticidad de la piel. Por ejemplo, la empresa suiza Penta Pharm ha lanzado diversos productos para el cuidado de la piel que contienen extractos de microalgas. Además, las microalgas son ricas en pigmentos como carotenoides (hasta un 14%), clorofila (del 0,5% al 1%) y proteínas ficobilínicas (del 20% al 50% en peso seco), lo que las hace ideales para la producción a gran escala de biopigmentos (Draaisma et al., 2013).

En el ámbito farmacéutico, las microalgas desempeñan un papel importante debido a sus diversas propiedades beneficiosas, que incluyen funciones antioxidantes, antihipertensivas, anticancerígenas, anticoagulantes e inmunomoduladoras (Samarakoon & Jeon, 2012). Además, su biomasa puede ser utilizada en la alimentación avícola gracias a su contenido abundante de proteínas digestibles y ácidos grasos omega-3. Asimismo, se emplean en la producción de fertilizantes orgánicos y biochar (Wang et al., 2013).

Los subproductos derivados del tratamiento de aguas residuales con microalgas comprenden una biomasa residual rica en nutrientes, como proteínas, lípidos y carbohidratos, junto con subproductos químicos como lípidos, ácidos grasos y carbohidratos, que son altamente aprovechables para la producción de biofertilizantes de alta calidad (Ángeles, R. et al., 2019). Asimismo, los subproductos orgánicos como los ácidos húmicos y fúlvicos se destacan por su capacidad para mejorar la fertilidad y la estructura del suelo (Chen, 2015).

Las microalgas pueden producir muchos productos para la agricultura, pero los principales son los siguientes:

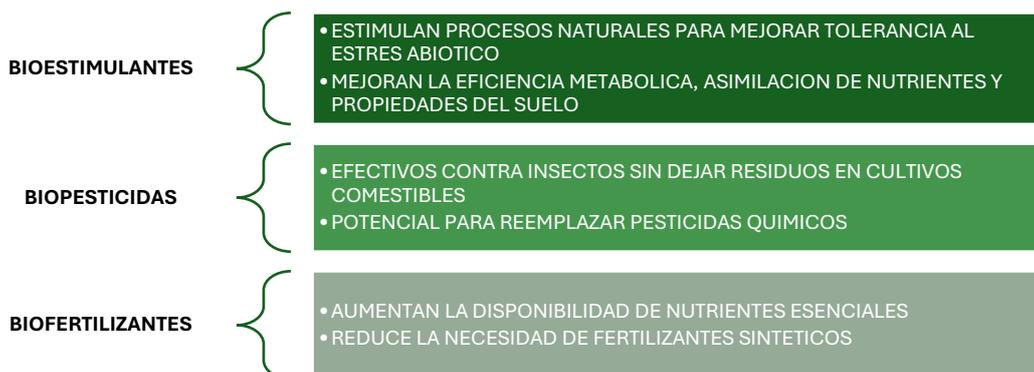


Imagen 3. Subproductos del desecho de las microalgas

- BIOESTIMULANTES

Según el Consejo Europeo de la Industria de los Bioestimulantes (EBIC), los bioestimulantes vegetales son sustancias o microorganismos que estimulan procesos naturales para mejorar la absorción de nutrientes, la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del cultivo cuando se aplican a las plantas o la rizosfera (Industria Europea de Bioestimulantes, 2012). A diferencia de los pesticidas, los bioestimulantes no actúan directamente contra las plagas y, por lo tanto, no están sujetos al marco regulatorio de los pesticidas. Los efectos de

Los bioestimulantes en las plantas incluyen la mejora de la eficiencia metabólica para aumentar el rendimiento y mejorar la calidad del cultivo, aumentar la tolerancia de la planta y su recuperación frente a los estreses abióticos, facilitar la asimilación, translocación y utilización de nutrientes, mejorar atributos de calidad de los productos (como contenido de azúcar, color, fructificación), optimizar la eficiencia del uso del agua, mejorar propiedades fisicoquímicas específicas del suelo y promover el desarrollo de microorganismos del suelo complementarios (Industria Europea de Bioestimulantes, 2012). Es importante tener en cuenta que los bioestimulantes pueden incluir productos con algunos nutrientes siempre que su impacto en el crecimiento de la planta no se deba principalmente a la fertilización directa. Los bioestimulantes operan a través de mecanismos diferentes a los de los fertilizantes, independientemente de la presencia de nutrientes en los productos (Industria Europea de Bioestimulantes, 2012).

Algunos estudios han demostrado las cualidades de los bioestimulantes en la biomasa microalgal. Por ejemplo, Martini en 2021 demostró la actividad biostimulante de la biomasa de *Chlorella sorokiniana* y *Chlamydomonas reinhardtii* en plantas de maíz cultivadas en condiciones hidropónicas (Martini et al., 2021). Otra investigación encontró que el tratamiento de semillas y la pulverización foliar de extractos del consorcio algal mixto influyen positivamente en la germinación de los tomates y la tasa de crecimiento de las plantas (K.V. et al., 2020).

- BIOPESTICIDAS

Los pesticidas producidos naturalmente u obtenidos a partir de fuentes biológicas se llaman biopesticidas. La principal preocupación para frutas y verduras comestibles es la presencia de residuos dejados por los pesticidas. Sin embargo, los biopesticidas abordan esta preocupación ya que no dejan residuos en los cultivos (Kumar, 2012). Además, los biopesticidas son efectivos contra los insectos y tienen un nivel similar de eficacia a los pesticidas sintéticos. También proporcionan un efecto inhibitorio en las etapas larvianas, contribuyendo al control de plagas y garantizando la protección de los cultivos (Kumar, 2012). Los biopesticidas tienen diferentes modos de acción para el manejo de plagas, como la inhibición de actividades metabólicas y la utilización de nutrientes (Mnif & Ghribi, 2015).

Algunos metabolitos secundarios en las microalgas exhiben actividades biocidas como actividades antibióticas, antifúngicas y antinematódicas (Swain et al., 2017). El descubrimiento inicial de compuestos biopesticidas en algas se realizó con un compuesto bioactivo del alga verde *Chlorella* (Mol, 2020). Este compuesto, conocido como clorellina, inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas (V. Gupta et al., 2013). Ahora, las investigaciones han avanzado mucho, y es posible pensar que los biopesticidas pueden reemplazar a los pesticidas químicos. Además, desde el punto de vista de la economía circular, los nutrientes necesarios para el crecimiento de las algas pueden proporcionarse a partir de residuos industriales, y los subproductos pueden suministrarse al medio para reducir el costo de producción sin afectar la sostenibilidad (Mol, 2020).

- BIOFERTILIZANTES

Los biofertilizantes son preparaciones que contienen microorganismos vivos o latentes, los cuales promueven el crecimiento de las plantas al aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes al mejorar la interacción planta-microorganismo (Vessey, 2003). Según Bhardwaj et al. (2014), los biofertilizantes desempeñan un papel crucial en la sostenibilidad

de los sistemas agrícolas al promover prácticas agrícolas más ecológicas y reducir la dependencia de los fertilizantes químicos. Los biofertilizantes pueden ser bacterianos, como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), hongos micorrícicos arbusculares (AMF), cianobacterias, o mezclas de estos. La aplicación de biofertilizantes mejora la estructura del suelo, aumenta la biomasa microbiana y promueve el crecimiento de las plantas a través de la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas (Bhardwaj et al., 2014).

Un ejemplo destacado es el uso de *Rhizobium* en leguminosas, que fija el nitrógeno atmosférico y mejora la fertilidad del suelo. Además, las micorrizas arbusculares mejoran la absorción de fósforo y otros nutrientes minerales, incrementando la eficiencia del uso de recursos y la resistencia de las plantas a estreses abióticos (Saito & Ezawa, 2016).

En resumen, mientras que los biofertilizantes facilitan la mejora de la estructura y fertilidad del suelo mediante la acción directa de microorganismos simbióticos, los bioestimulantes actúan como potenciadores de las funciones naturales de las plantas, mejorando su capacidad de adaptación y aprovechamiento de recursos. La integración adecuada de ambos enfoques puede jugar un papel crucial en la promoción de prácticas agrícolas sostenibles y en la mejora de la seguridad alimentaria global (Hawkins et al., 2020).

1.5. Clasificación de los bioestimulantes

A continuación se presenta una clasificación de los bioestimulantes basada en su origen, componente principal y modo de acción. Esta clasificación, aunque no siempre proporciona la información más precisa sobre la actividad biológica del producto, ayuda a entender la variedad de bioestimulantes disponibles.



Imagen 4. Tipos de bioestimulantes y sus funciones más importantes

- Algas Marinas y Extractos de Plantas

Las algas marinas comprenden algas macroscópicas y multicelulares de diversos grupos taxonómicos como las algas pardas, rojas y verdes. Históricamente, las algas han sido utilizadas en agricultura por sus beneficios probados en cultivos. Hoy en día, los extractos de algas marinas se emplean como acondicionadores de suelo o bioestimulantes vegetales, frecuentemente aplicados por vía foliar. Estos extractos mejoran el crecimiento y rendimiento de los cultivos, la calidad del producto y aumentan la tolerancia al estrés abiótico. Contienen hormonas vegetales como citoquininas y auxinas, junto con minerales y compuestos bioactivos como laminarina, fucoidano y alginatos (Franzoni et al., 2022).

Los bioestimulantes también se derivan de plantas ricas en metabolitos secundarios que activan respuestas fisiológicas en las plantas. Por ejemplo, extractos de borraja han demostrado efectos positivos en el crecimiento y calidad de la lechuga. Otra planta prometedora es *Withania somnifera*, rica en withanólidos, compuestos con potencial bioestimulante en agricultura.

- Sustancias Húmicas

Las sustancias húmicas, incluyendo ácidos húmicos y fúlvicos, son componentes naturales de la materia orgánica del suelo, formados por la descomposición de plantas, animales y microorganismos, y modificados por la actividad microbiana. Estas sustancias estimulan el crecimiento radicular, mejoran la absorción de nutrientes y agua, y aumentan la tolerancia al estrés ambiental. A pesar de su complejidad molecular, se les atribuyen efectos beneficiosos tanto hormonales como otros mecanismos independientes (Franzoni et al., 2022).

- Proteínas Hidrolizadas y Compuestos que Contienen Nitrógeno

Los hidrolizados de proteínas son mezclas de aminoácidos, péptidos y polipéptidos obtenidos mediante hidrólisis química, enzimática o térmica de proteínas de diversas fuentes biológicas. En cultivos hortícolas, se ha demostrado que estos hidrolizados mejoran el crecimiento de los cultivos y su tolerancia a los estreses abióticos. Sin embargo, la falta de información sobre su composición es un desafío para entender sus mecanismos de acción a nivel molecular y bioquímico. (Franzoni et al., 2022).

- Microorganismos

Este grupo incluye bacterias, levaduras y hongos filamentosos, aislados del suelo, plantas y otros materiales orgánicos. Se aplican al suelo o a las semillas y pueden aumentar la productividad de los cultivos de manera directa, a través de asociaciones simbióticas como las micorrizas, o indirectamente, incrementando la biodisponibilidad de nutrientes. En la regulación europea de fertilizantes, los microorganismos como *Azotobacter* spp., *Mycorrhiza*, *Rhizobium* spp. y *Azospirillum* spp. están reconocidos como bioestimulantes. (Franzoni et al., 2022).

- Compuestos Inorgánicos con Acción Bioestimulante

Los elementos químicos que promueven el crecimiento de las plantas sin ser esenciales para todas ellas se denominan elementos beneficiosos. Los principales incluyen selenio, silicio, cobalto, aluminio y sodio, presentes en el suelo y las plantas como sales inorgánicas. Estos elementos pueden fortalecer las paredes celulares, por ejemplo, con depósitos de sílice, o inducir efectos transitorios positivos tras la exposición a estreses abióticos. La definición de

elementos beneficiosos no se limita a su naturaleza química, sino también a los contextos específicos en los que se observan sus efectos positivos en el crecimiento de las plantas y la respuesta al estrés (Franzoni et al., 2022).

1.6. Bioestimulantes y Tolerancia al Estrés Abiótico

Identificar los mecanismos activados por los bioestimulantes en respuesta al estrés es un desafío complejo y un área de investigación activa. Los bioestimulantes son productos que incluyen sustancias y microorganismos capaces de estimular los procesos naturales de las plantas, promoviendo un crecimiento saludable y eficiente incluso en condiciones adversas. Cuando las plantas se enfrentan a situaciones de estrés, como sequía, salinidad, temperaturas extremas y deficiencias nutricionales, su metabolismo puede verse gravemente afectado, lo que compromete su desarrollo y productividad. Los bioestimulantes intervienen en estos procesos activando vías metabólicas específicas que ayudan a las plantas a adaptarse y superar estas condiciones estresantes.

Un aspecto crucial de la acción de los bioestimulantes es su capacidad para aumentar la producción de metabolitos con propiedades antioxidantes en las plantas. Estos antioxidantes son fundamentales para neutralizar los radicales libres, que son moléculas inestables y altamente reactivas producidas en respuesta al estrés. Los radicales libres pueden causar daño oxidativo a las células, afectando membranas, proteínas y ácidos nucleicos, lo que resulta en una reducción de la vitalidad y el rendimiento de la planta. Al aumentar la producción de antioxidantes, los bioestimulantes ayudan a proteger las plantas de estos efectos degenerativos, mejorando su resistencia y capacidad de recuperación. Además, los bioestimulantes pueden influir en la síntesis de otros compuestos beneficiosos, como osmoprotectores, hormonas vegetales y otros metabolitos secundarios, que juegan roles esenciales en la adaptación al estrés y la mejora del crecimiento general de las plantas (Franzoni et al., 2022).

Los tipos de estrés más importante son los siguientes:



Imagen 5. Tipos de estrés y sus efectos

- Estrés por Sequía

El estrés hídrico es uno de los problemas más comunes que afecta directamente la fotosíntesis, comprometiendo el rendimiento y la calidad de los cultivos. Los síntomas visibles incluyen la pérdida de turgencia y el amarillamiento de las hojas. Bioestimulantes como Actiwave y Wokozim, derivados de algas marinas, aumentan la acumulación de compuestos osmóticamente activos, ayudando a las plantas a mantener el balance hídrico y superar períodos de sequía sin pérdida de rendimiento. Por ejemplo, el extracto de *Ascophyllum nodosum* ha demostrado mejorar la tolerancia al estrés hídrico en brócoli y espinaca, reduciendo el cierre estomático y manteniendo niveles de clorofila bajo condiciones de estrés (Franzoni et al., 2022).

- Estrés por Salinidad

El estrés salino afecta principalmente a cultivos en áreas costeras debido a la alta concentración de sales en el suelo o el agua de riego. Este estrés reduce el crecimiento y daña las células, comprometiendo la productividad. Los bioestimulantes pueden aumentar la tolerancia a la salinidad incrementando la concentración de prolina, azúcares y compuestos antioxidantes, aliviando así los efectos del estrés salino. Hidrolizados de proteínas vegetales y tratamientos con *Azospirillum brasilense* han mostrado mejorar la tolerancia a la salinidad y aumentar el rendimiento en cultivos como la lechuga y los pimientos (Franzoni et al., 2022).

- Estrés por Temperaturas Extremas

Las bajas temperaturas, especialmente en primavera, pueden causar daños significativos en cultivos con floración temprana. Bioestimulantes como BactorS13 y Flortis Micorrize han demostrado contrarrestar la reducción del crecimiento bajo estrés por frío al aumentar osmólitos y compuestos antioxidantes. Además, bioestimulantes basados en algas y aminoácidos pueden inducir protección contra el frío mediante la acumulación de sustancias crioprotectoras. Las altas temperaturas alteran las membranas celulares y las funciones enzimáticas, causando daños. Los bioestimulantes pueden aumentar la capacidad de absorción de agua y la acumulación de sustancias protectoras de membranas, mejorando la tolerancia al calor (Franzoni et al., 2022).

- Estrés por Deficiencias Nutricionales

Las deficiencias nutricionales pueden resultar de una gestión agronómica incorrecta o condiciones del suelo no óptimas. Los bioestimulantes pueden aumentar la biomasa radicular, mejorando la capacidad de absorción de nutrientes. Bioestimulantes como AminoPrim y AminoHort han demostrado promover la absorción de nutrientes incluso en bajas concentraciones. Esto sugiere que todos los bioestimulantes que aumentan la biomasa radicular pueden ayudar a mitigar los efectos de las deficiencias nutricionales difíciles de manejar con la fertilización convencional (Franzoni et al., 2022).

1.7. Características comunes de los bioestimulantes

Una designación común de bioestimulantes se justifica solo si las sustancias y microorganismos descritos comparten ciertas características clave en cuanto a su naturaleza, funciones y usos. Estas características son fundamentales para cualquier definición, ya que proporcionan un marco coherente y estandarizado que puede ser utilizado por investigadores, reguladores y profesionales del sector agrícola. La falta de una definición precisa podría llevar

a confusiones y malentendidos, dificultando la correcta aplicación y regulación de estos productos.

Los bioestimulantes se diferencian de otros productos agrícolas como los fertilizantes y pesticidas debido a sus modos de acción únicos y sus amplias aplicaciones. Mientras que los fertilizantes proporcionan nutrientes esenciales directamente a las plantas y los pesticidas protegen contra plagas y enfermedades, los bioestimulantes actúan sobre los procesos fisiológicos de las plantas para mejorar su crecimiento y resistencia al estrés. Esta distinción es crucial para entender el papel específico que los bioestimulantes pueden desempeñar en la agricultura moderna, especialmente en contextos de sostenibilidad y eficiencia agrícola.

A partir de la revisión bibliográfica, se pueden extraer las siguientes conclusiones que definen las características y el potencial de los bioestimulantes en el campo agrícola (Patrick du Jardin, 2015).

Diversidad en la naturaleza: Los bioestimulantes abarcan tanto sustancias como microorganismos. Las sustancias pueden ser compuestos únicos, como la betaína de glicina, o mezclas de compuestos de origen natural cuya composición y componentes bioactivos no están completamente caracterizados, como los extractos de algas marinas. Aunque los compuestos revisados son producidos naturalmente, no se deben excluir los compuestos sintéticos, especialmente ciertos reguladores del crecimiento de las plantas, como los nitrofenolatos. Los inoculantes microbianos pueden contener cepas únicas, como *Bacillus subtilis*, o mezclas de microorganismos con efectos aditivos o sinérgicos. Según la literatura científica revisada por pares y la documentación de las empresas, los bioestimulantes pueden referirse a ingredientes bioactivos o a productos comercializados que los combinan, a menudo añadiéndolos a fertilizantes o productos de protección de cultivos. Cualquier definición reglamentaria deberá aclarar si se cubren los ingredientes, los productos finales o ambos (Patrick du Jardin, 2015).

- Funciones fisiológicas diversas:

Las funciones fisiológicas de los bioestimulantes abarcan una amplia gama de acciones sobre los procesos de las plantas. Ejemplos de estas funciones incluyen la protección del aparato fotosintético contra el fotodaño y la iniciación de raíces laterales. Estas funciones están respaldadas por mecanismos celulares, como la eliminación de oxígeno reactivo por antioxidantes o el aumento de la síntesis de transportadores de auxinas. Estas funciones fisiológicas y los mecanismos celulares subyacentes se pueden referir colectivamente como "modos de acción" de los bioestimulantes. Estos modos de acción explican las funciones agrícolas de los bioestimulantes, como una mayor tolerancia al estrés abiótico o una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno. Estas funciones agrícolas pueden traducirse en beneficios económicos y ambientales: mayor rendimiento de cultivos, ahorro de fertilizantes, mayor calidad y rentabilidad de los productos agrícolas, y mejora de los servicios ecosistémicos (Patrick du Jardin, 2015).

- Efectos demostrados científicamente:

Todos los bioestimulantes convergen en al menos una o varias de las siguientes funciones agrícolas: mejoran la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o las características de calidad del cultivo. Estas características de calidad pueden incluir el valor nutricional, el contenido de proteína del grano, la vida útil, entre otros. Estas acciones convergentes deben ser la base de cualquier definición de bioestimulantes. Aunque muchos

bioestimulantes también estimulan la respuesta a patógenos mediante elicidores y reguladores de genes de plantas, existe un consenso creciente entre reguladores y partes interesadas para mantener separados la bioestimulación y el biocontrol desde un punto de vista reglamentario. Por lo tanto, el estrés biótico queda fuera del alcance de la definición (Patrick du Jardin, 2015).

- Beneficios económicos y ambientales:

La definición de estos beneficios depende de las políticas agrícolas y ambientales, tanto en términos de objetivos como de puntos finales de evaluación. Aunque los incentivos para desarrollar bioestimulantes están vinculados a estos aspectos, no deben ser la base para una definición basada en la ciencia de los bioestimulantes (Patrick du Jardin, 2015).

En conclusión, cualquier definición de bioestimulantes debe centrarse en sus funciones agrícolas, no en la naturaleza de sus componentes ni en sus modos de acción, tal como se han definido anteriormente.

1.8. Normativa

La regulación de los bioestimulantes presenta actualmente una notable complejidad, principalmente debido a la falta de un marco específico y armonizado tanto en la Unión Europea (UE) como en los Estados Unidos. Esta situación se deriva, en gran medida, de la carencia de una definición formal y de la aceptación del concepto por parte de las entidades reguladoras.

En Europa, los bioestimulantes se introducen en el mercado siguiendo principalmente dos vías: las regulaciones nacionales sobre fertilizantes o la legislación europea de pesticidas. La regulación de la CE N.º 1107/2009 sobre productos fitosanitarios es aplicable a todas las categorías de bioestimulantes, dado que la definición amplia de productos fitosanitarios incluye cualquier sustancia que influya en los procesos vitales de las plantas, excepto como nutriente. Por ello, desde una perspectiva regulatoria estricta, los bioestimulantes se consideran productos fitosanitarios. Sin embargo, los procedimientos para registrar productos fitosanitarios son prolongados y costosos, lo que representa un desafío, especialmente para las pequeñas y medianas empresas que desarrollan bioestimulantes. Considerando que la mejora de la nutrición y el crecimiento de las plantas son los principales objetivos de los bioestimulantes, muchas empresas optan por la vía de los fertilizantes a nivel nacional. No obstante, la regulación de la CE N.º 2003/2003 sobre fertilizantes tiene una definición restrictiva que no incluye a los bioestimulantes, ya que estos no cumplen con la función principal de proporcionar nutrientes a las plantas. Aunque se han realizado enmiendas para incluir algunos aditivos de fertilizantes que mejoran su rendimiento, este proceso es demasiado laborioso para aplicarse a todos los bioestimulantes (du Jardin, 2015).

En Estados Unidos, la situación es similar a la de Europa, con la falta de una definición aprobada de bioestimulantes y la falta de armonización entre los 50 estados. Se utilizan leyes de fertilizantes a nivel estatal para la comercialización de ciertos bioestimulantes, mientras que se trabaja en conjunto entre partes interesadas, representantes de organismos reguladores y agencias federales para mejorar la certeza legal que rodea a los bioestimulantes. Es probable que algunos bioestimulantes caigan bajo la jurisdicción de la Agencia de Protección Ambiental (EPA), mientras que otros se registren como fertilizantes o enmiendas del suelo a nivel estatal.

La última directiva europea, REGULACIÓN (UE) 2019/1009, establece estándares uniformes de seguridad para la seguridad, calidad y requisitos de etiquetado de productos fertilizantes. Introduce límites en contaminantes tóxicos y microorganismos patógenos, garantizando así un alto nivel de protección del suelo y reduciendo los riesgos tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Dependiendo de la categoría del producto, también exige un contenido mínimo de nutrientes y otras características relevantes. La evaluación de conformidad de los productos fertilizantes de la UE debe realizarse de manera confiable y reproducible. Además, permite a los productores modificar sus procesos de fabricación para cumplir con los nuevos límites. La regulación abarca siete categorías de productos fertilizantes, a saber (UE, 2019):

1. Fertilizantes, tales como:
 - a. Fertilizantes inorgánicos
 - b. Fertilizantes organo-minerales*
 - c. Fertilizantes orgánicos*
2. Enmiendas del suelo*
3. Enmiendas de caliza
4. Sustratos de cultivo*
5. Inhibidores*
6. Bioestimulantes vegetales*
7. Mezclas de fertilizantes

(*No estaban incluidos previamente en las normas de armonización).

Los componentes regulados que deben declararse son la humedad, nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), azufre (S), carbono orgánico (Corg), cadmio (Cd), cromo hexavalente (Cr VI), mercurio (Hg), arsénico (As), níquel (Ni), plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn), *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* o *Enterococcaceae*; los límites o concentraciones mínimas dependen de la categoría del producto.

Esta normativa también clasifica los componentes de los materiales (CMC) en once grupos diferentes, y posiblemente exista una laguna en la definición si las microalgas entran en alguno de estos grupos, ya que generalmente solo se habla de algas y cianobacterias, pero no se define si las microalgas están dentro de lo que significa por algas o solo las macroalgas. Esta laguna se cerraría parcialmente cuando se aprueben la nueva directiva en ECONOMÍA AZUL - HACIA UN SECTOR DE ALGAS DE LA UE FUERTE Y SOSTENIBLE y la Directiva de Marco de Residuos (WFD). Donde se indicará que la producción de algas puede integrarse en otras actividades industriales, como el tratamiento de aguas residuales y la captura de CO₂ industrial. También facilitará el uso de materiales recuperados de algas cultivadas en residuos o de algas que tengan ellas mismas un estatus de residuo en la producción de productos fertilizantes de la UE. En este sentido, los productos relevantes de algas pueden cumplir con los criterios de fin de residuo, que se espera que se revisen a fines de 2023.

En España, la legislación más reciente y actual es el Real Decreto 999/2017, en esta legislación, los tipos de fertilizantes se categorizan de manera diferente, utilizando las siguientes clasificaciones:

- Grupo 1: Fertilizantes inorgánicos nacionales.
- Grupo 2: Fertilizantes orgánicos.
- Grupo 3: Fertilizantes organo-minerales.

- Grupo 4: Otros fertilizantes y productos únicos.
- Grupo 5: Enmiendas de caliza.
- Grupo 6: Enmiendas orgánicas.
- Grupo 7: Otras enmiendas.

En estas categorizaciones, hay algunas donde hay una laguna y las microalgas pueden estar bajo sus características. Y hay algunos requisitos especiales cuando se aplica algas puras, pero es cuando es solo un tipo de alga cultivada en un sustrato regulado. Entonces, la principal categorización donde se podría introducir las microalgas como fertilizante es en los fertilizantes orgánicos. También existe un Anexo V en este decreto que indica los parámetros que deben medirse para los productos fertilizantes fabricados utilizando residuos y otros componentes orgánicos. Estos son los siguientes:

- Porcentaje de nitrógeno orgánico (al menos el 85% del nitrógeno total)
- Humedad (máximo 14%)
- Granulometría (el 90% del producto fertilizante debe pasar por un tamiz de 10 mm a menos que se especifique una figura diferente en la especificación del tipo. Este requisito no se aplica a productos granulados o pelletizados industrialmente).
- Límite máximo de microorganismos: Salmonella: Ausente en 25 g de producto terminado y Escherichia coli: <1000 número más probable (NMP) por gramo de producto terminado.
- Límite máximo de metales pesados: no debe exceder el contenido de metales pesados indicado en la siguiente tabla, dependiendo de si pertenecen a la Clase A, B o C:

Tabla 1 Límites de concentración de metales pesados en fertilizantes según el anexo V del Real Decreto 999/2017 (Ministerio de la presidencia, 2017)

Metales pesados	Límite de concentración		
	(Sólidos: mg/kg en materia seca) Líquidos: mg/kg		
	Clase A	Clase B	Clase C
Cadmio	0.7	2	3
Cobre	70	300	400
Níquel	25	90	100
Plomo	45	150	100
Zinc	200	500	1000
Mercurio	0.4	1.5	2.5
Cromo	70	250	300
Cromo VI	No detectable acorde al método oficial	No detectable acorde al método oficial	No detectable acorde al método oficial

Tabla 1. Límite de concentración de metales pesados en fertilizantes

Clase A: Productos fertilizantes cuyo contenido de metales pesados no excede ninguno de los valores en la columna A.

Clase B: Productos fertilizantes cuyo contenido de metales pesados no excede ninguno de los valores en la columna B.

Clase C: Productos fertilizantes cuyo contenido de metales pesados no excede ninguno de los valores en la columna C.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es evaluar la capacidad de diferentes pretratamientos de biomasa de microalgas procedentes de las AR para la producción de biofertilizante y bioestimulante.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una revisión bibliográfica sobre el uso de microalgas como bioestimulantes.
- Cultivar y cosechar biomasa de microalgas en agua residual urbana.
- Pretratar y caracterizar la biomasa utilizando diferentes métodos: congelación, homogenización mecánica (sonicado) y liofilización.
- Monitorear y registrar el crecimiento de las plantaciones de *Ocimum basilicum* tras la aplicación de la biomasa.
- Analizar variables físicas y nutricionales en las plantaciones de *Ocimum basilicum* según los diferentes tratamientos de la biomasa y tipos de sustratos.
- Evaluar el efecto de los diferentes métodos de tratamiento de la biomasa en el rendimiento de las plantas de *Ocimum basilicum*.
- Evaluar la efectividad de la biomasa como biofertilizante y bioestimulante en plantaciones de *Ocimum basilicum* en distintos tipos de sustratos.
- Comparar la eficiencia de la biomasa pretratada de microalgas aplicada a diferentes tipos de sustratos utilizando métodos estadísticos para determinar la significancia de las diferencias observadas entre los tratamientos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño de experimento:

Para evaluar la biomasa algal cultivada en agua residual urbana, se lleva a cabo un diseño experimental que nos permite investigar su utilidad como biofertilizante y también investigar si los diferentes tratamientos a la biomasa ofrecen mejoras en sus resultados. Finalmente, se busca determinar si existen diferencias significativas que puedan catalogar algún tratamiento como bioestimulante.

Variables de diseño	
Pretratamientos	- Blanco - Biofertilizante congelado - Biofertilizante sonicado - Biofertilizante liofilizado
Especie cultivada	Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i> L.)
Sustrato utilizado	Normalizado (SPHAGNUM) Suelo real
Replicas	3 replicas por tratamiento
Dosis Biofertilizante	200 kgN/hm ²
Tasa de riego	20-40 ml de agua diarios
Cantidad de semillas por replica	5 semillas
Periodo de observación	8 semanas
Ciclo luz: oscuridad	14:10

Tabla 2. Resumen diseño de experimento

El experimento se llevó a cabo en dos fases distintas, diferenciadas únicamente por el tipo de sustrato utilizado en cada una. En la primera fase, se empleó SPHAGNUM, un tipo de musgo conocido por su capacidad para retener agua y nutrientes, proporcionando un entorno óptimo para el crecimiento inicial de las plántulas. Esta elección buscaba maximizar el potencial de absorción de los fertilizantes aplicados, observar su efecto en condiciones ideales y poder comparar los resultados con estudios existentes y con la segunda fase del experimento.

Para la segunda fase, se utilizó un suelo real. Este tipo de sustrato representa un desafío mayor para el crecimiento de las plantas, permitiendo evaluar la eficacia de los diferentes fertilizantes y tratamientos en condiciones menos controlada.

En el diseño se planifica para evaluar cuatro tratamientos diferentes: 1) Blanco (Control), 2) Biofertilizante congelado, 3) Biofertilizante sonicado, y 4) Biofertilizante liofilizado.

El ensayo se llevó a cabo con semillas de Albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en las instalaciones del Laboratorio IIAMA. Se utilizaron macetas con las siguientes características: diámetro de 11,5 cm, área de siembra de 103,87 cm², profundidad de 10,50 cm y un volumen de 1,09 litros.

La dosis de biofertilizante aplicada en cada caso fue de 200 kgN/hm². Esta cantidad se seleccionó basándose en la investigación previa disponible en la literatura científica. (Alvarez-González, 2022)

Para cada fase se empleó un periodo de observación de 8 semanas lo que se traduce a aproximadamente a 56 días durante los meses de Abril y Junio de 2024. Durante este tiempo,

el experimento se desarrolló, bajo condiciones de luz natural con un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 (correspondiente al fotoperiodo natural durante esta época del año).

Se realizaron mediciones y análisis periódicos del largo y grosor del tallo para evaluar el efecto de los tratamientos en las variables de interés.

Se realizaron en todos los tratamientos tres réplicas, y cada réplica contenía 5 semillas que se convertirían en brotes para ser observados.

El riego se realizó a una tasa de 20-40 ml diarios. El riego se suministró diariamente y la cantidad de agua se ajustó semanalmente para evitar déficits de agua mientras se lograba un drenaje mínimo para prevenir la pérdida de nutrientes por lixiviación. La humedad del suelo se registró durante todo el período experimental, manteniéndola en el rango de 50-60%.

La profundidad de aplicación del biofertilizante fue de 30 mm en todos los casos, mientras que la profundidad de siembra de la semilla fue de 3 veces el diámetro de la semilla, según las instrucciones del empaque.

La configuración de cada fase del experimento fue la misma y seguían el siguiente esquema:



Imagen 6. Esquema de plantación

3.2. Biomasa de microalgas

La biomasa procede de un cultivo de microalgas con agua residual procedente del decantador primario de la EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia). El cultivo estuvo compuesto principalmente de microalgas género *Scenedesmus*.

La caracterización del efluente utilizado para el cultivo se muestra en la siguiente tabla:

Parámetro	Decantador primario
NT (mg N/L)	26,6 ± 4,81
P-PO4 (mg P/L)	6,06 ± 2,52
DQO (mg/L)	278,5 ± 4,95
B. E.Coli (ud/ml)	42000 ± 1414,21

Tabla 3. Caracterización efluente.

El cultivo se desarrolló en 2 fotobiorreactores a escala de laboratorio, con un volumen de trabajo de 8 L (diámetro interno de 20 cm) en bathc. El cultivo fue aireado mediante cuatro difusores de burbujas finas colocados en la parte inferior para lograr una homogeneización adecuada y evitar la formación de biofilm en las paredes. La iluminación fue proporcionada

por tres lámparas LED blancas frías, con una intensidad lumínica promedio de $92 \pm 20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ medida en la superficie del reactor en 12 puntos diferentes.

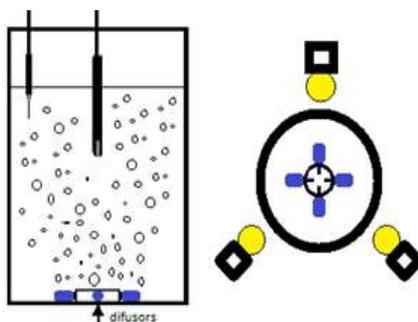


Imagen 8. Esquema de fotobiorreactores



Imagen 7. Imágenes del cultivo

El cultivo se llevó a cabo durante los meses febrero a abril de 2024, tiempo necesario para cultivar la cantidad de biomasa algal requerida según el diseño experimental. La duración de cada cultivo fue de 5 ± 1 día, asegurando así la eliminación de la bacteria *E. coli*. Durante todo el proceso, se realizó un monitoreo manual del pH del cultivo de microalgas para mantenerlo dentro del rango óptimo de 6 a 7.

Una vez alcanzado el tiempo de retención se centrifugó el cultivo para separar la biomasa del agua y realizar el análisis y tratamiento del biofertilizante.

3.3. Tratamientos de la biomasa

3.3.1. Centrifugado

El cultivo de microalgas se sometió a proceso de centrifugación en alícuota de 50 mL en tubos de centrifuga, a 6.000 RPM por 4 minutos. (ThermoFisher Scientific- Laboratory Centrifuge-2016).



Imagen 9. Centrifugadora ThermoFisher Scientific

3.3.2. Tratamiento 1. Congelado:

El inicio del proceso de congelado de la biomasa de microalga dependía de las condiciones de producción, entre ellas el tiempo de retención en los fotobiorreactores. El objetivo principal de este pretratamiento era romper las células mediante una congelación gradual y controlada, permitiendo así la liberación de los contenidos celulares. Para ello, la biomasa concentrada se almacenó a -20°C durante $49 \pm 18,5$ días.

3.3.3. Tratamiento 2. Homogeneización mecánica (Sonicado):

La homogeneización mecánica de la biomasa algal consiste en descomponer y mezclar uniformemente las partículas de la muestra para crear una solución homogénea. Este proceso sirve para reducir el tamaño de las microalgas, mejorando la solubilidad y la biodisponibilidad de ciertos compuestos dentro de la misma (Lee et al., 2017).

Este pretratamiento se realiza después del proceso de centrifugado. La homogeneización de la biomasa se realizó durante 5 minutos a 25,000 RPM (Ultra Turax), garantizando una preparación óptima del material. Posteriormente, el producto se almacenó en las mismas condiciones descritas que en el proceso de congelado hasta su utilización en el cultivo.

La sonicadora que se ha utilizado es la Ultra Turax T 25.



Imagen 10. Ultra Turax T 25

3.3.4. Tratamiento 3: Liofilización:

La liofilización, el tercer proceso de tratamiento aplicado a la biomasa de microalgas, es un método de deshidratación que elimina el agua mediante sublimación de la biomasa congelada (Su ,2024). Este pretratamiento se elige por su capacidad para preservar la masa celular y los nutrientes de las algas.

Durante el proceso, la biomasa se congela a -40°C durante aproximadamente 24 horas, luego se somete a un vacío de aproximadamente 100 mTorr para facilitar la sublimación del agua. La temperatura del condensador se mantiene a -50°C para condensar el vapor de agua sublimado. Estas condiciones generan un producto final ligero y fácil de almacenar, conservando las propiedades nutricionales de las algas durante períodos prolongados (Su ,2024).



Imagen 11. Liofilizador

3.4. Caracterización del suelo

El suelo utilizado para la fase dos del experimento fue obtenido de la región local de Alzira, Valencia (39° 06' 18" N, 0° 21' 34" W). A continuación se muestran las principales características del suelo:

Característica	
Textura	Franco Arcilloso
Ph	6,66
Conductividad	0.210 mS

Tabla 4. Características del suelo



Imagen 12. Suelo

3.5. Medidas analíticas y métodos

3.5.1. Ensayos en plantas:

Mediciones durante el tiempo de observación (56 días):

Parámetro	Unidades
Longitud del tallo	mm
Grosor del tallo	mm
Número de hojas	nº
Día de germinación	día

Tabla 5. Parámetros medidos durante tiempo de observación

Mediciones al final del periodo de observación:

Parámetro	Unidades
Longitud del tallo	mm
Grosor del tallo	mm
Número de hojas	nº
Día de germinación	día
Longitud de las raíces y de las hojas más altas extendidas	mm
Longitud de las hojas más altas extendidas	mm
Peso fresco y seco	g
Contenido de clorofila en tejido foliar	mg g ⁻¹
Concentración de nitrógeno en tejido foliar	% N
Concentración de fósforo en tejido foliar	% P

Tabla 6. Parámetros medidos al final del tiempo de observación

Durante el período de observación, se midieron varios parámetros de crecimiento de las plantas de albahaca, (tabla 6)). Estos datos fueron registrados para cada planta durante el estudio para monitorizar su desarrollo.

Después del período de observación inicial, se realizaron nuevas mediciones para obtener una evaluación completa del crecimiento de las plantas. (tabla xx) Estas mediciones permitieron evaluar la biomasa y el rendimiento de las plantas tratadas con biofertilizante de microalgas.

Se realizaron análisis adicionales al finalizar el experimento, se incluyó un análisis del contenido de clorofila en las hojas de las plantas y el análisis de la concentración de macronutrientes, específicamente el nitrógeno y el fosforo, comparando los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, para evaluar la actividad fotosintética.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado, se presentan los resultados obtenidos a lo largo del experimento. Se comenzará con el análisis de la caracterización y preparación de la biomasa de microalgas mediante diferentes métodos (congelación, homogenización mecánica (sonicado) y liofilización), detallando sus características físicas y químicas, incluyendo composición nutricional y estructura celular.

Luego se describirán los resultados del monitoreo del crecimiento de las plantaciones de *Ocimum basilicum* tras la aplicación de la biomasa tratada, evaluando parámetros como altura, número de hojas, desarrollo radicular y composición nutricional general de las plantas.

Finalmente, se discutirá el efecto de la biomasa tratada de microalgas como biofertilizante y bioestimulante en plantaciones de *Ocimum basilicum* en diferentes sustratos. Se comparará el rendimiento vegetal y la absorción de nutrientes, empleando análisis estadísticos para determinar la significancia de las diferencias observadas entre los tratamientos aplicados.

4.1. Caracterización y dosificación del biofertilizante

Para determinar la dosis del biofertilizante que se debe añadir a cada tratamiento y replica, se llevó a cabo una caracterización del biofertilizante de partida en términos de sólidos y contenido de nutrientes (Tabla 7).



Imagen 13. Biofertilizante

Las características del biofertilizante obtenido se muestran en la siguiente tabla:

Parámetro	Valor
SS (mg/L)	112.145,45
%SS	10,83
NT (mg/L)	3.218,05
%N MD	2,87
P-PO4 (mg/L)	415,50
%P MD	0.37
N:P	8:1

Tabla 7. Caracterización del biofertilizante obtenido

Como se puede observar el contenido de nitrógeno obtenido en la biomasa cumple con la normativa actual que exige un contenido mínimo del 2% para fertilizantes orgánicos (Real Decreto 506/2013,). Además, acorde a lo planteado por Park et al. (2011), que reportó que la relación N:P en la biomasa de microalgas en sistemas de tratamiento de AR puede variar de 4:1 a 40:1, dependiendo de la especie y la disponibilidad de nutrientes, en este estudio, se obtuvo una relación N:P de 8:1, que se encuentra dentro del rango mencionado,

Este análisis detallado permite calcular la cantidad exacta de biofertilizante necesaria para cumplir con una dosis de 200 kgN/hm², valor seleccionado en base a la revisión de la literatura científica disponible (Álvarez-González et al., 2022).

A continuación se muestran las cantidades necesarias de cada tipo de biofertilizante en dosis de 200kgN/hm² (Tabla 8).

Tratamiento	Dosis por maceta
Blanco	-
Biofertilizante Congelado	7,24 g
Biofertilizante Sonicado	7,24 g
Biofertilizante Liofilizado	0,78 g

Tabla 8. Dosificación de biofertilizante por maceta



Imagen 14. Aspecto visual dosificación. Fase 1.

En función de las características de las macetas y la dosis de biofertilizante seleccionado, se estableció una dosis de 207,74 mg de N por maceta para cada tratamiento con biofertilizante. Para alcanzar esta dosis, tanto en el caso del biofertilizante congelado como del sonicado, se aplicaron 7,24 g de biofertilizante por maceta. En cuanto al biofertilizante liofilizado, se utilizó una cantidad de 0,7840 g, teniendo en cuenta que los sólidos representaban el 10,83% del biofertilizante fresco.

4.2. Efectos en la germinación

Se usó la tasa de germinación de los distintos tratamientos como un indicador inicial. para comparar los efectos de los tratamientos con biofertilizante de microalgas en la germinación de semillas de albahaca y, luego, explorar otros parámetros de crecimiento de las plantas bajo los mismos efectos.

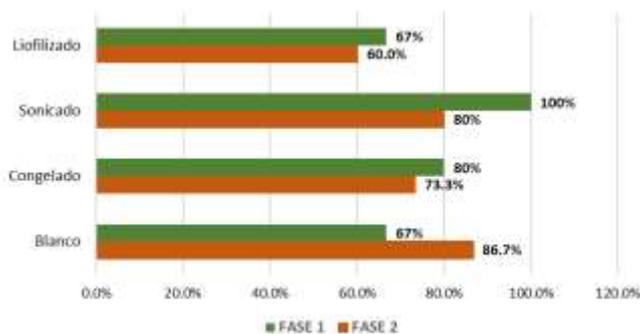


Imagen 15 Grafica tasa de crecimiento. Fase 1 (SPHAGNUM) y Fase 2 (Suelo real).

Tratamientos	Semillas sembradas	Germinaciones	Tasa de germinación (fracción)
BLANCO	15	10	0,66 ± 0,48 a
CONGELADO	15	12	0,8 ± 0,43 a
SONICAD	15	15	1 ± 0,00 a
LIOFILIZADO	15	10	0,66 ± 0,48 a

Tabla 9. Datos de germinación. Fase 1.



Imagen 16. Visualización de todos los brotes germinados. Fase 1. Día 20 de observación.

Tratamientos	Semillas sembradas	Germinaciones	Tasa de germinación (fracción)
BLANCO	15	13	0,87 ± 0,35 a
CONGELADO	15	11	0,73 ± 0,45 a
SONICADO	15	12	0,8 ± 0,41 a
LIOFILIZADO	15	9	0,60 ± 0,51 a

Tabla 10. Datos de germinación. Fase 2.

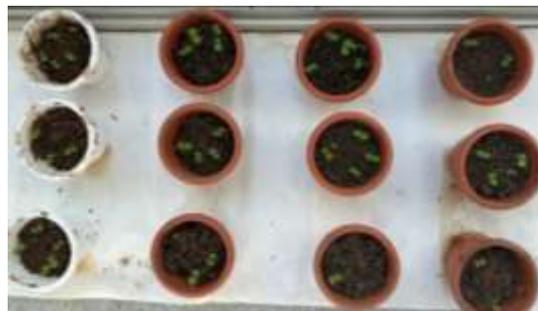


Imagen 17. Visualización de todos los brotes germinados. Fase 2. Día 17 de observación

Los datos presentados para la tasa de germinación en la fase 1 (Tabla 9), muestran que los distintos tratamientos aplicados no ejercen un impacto significativo en el proceso de germinación de las semillas de albahaca (p -Valor = 0,087, prueba ANOVA). Aunque se observa que el grupo "Sonicado" exhibe la tasa de germinación más alta, con un promedio de 1,00, seguido por el grupo "Congelado", cuyo promedio alcanza 0.80, los grupos "Blanco" y "Liofilizado" muestran los promedios más bajos en comparación. Sin embargo, estas disparidades podrían atribuirse a factores como la calidad de las semillas, el tipo de sustrato utilizado, la humedad del ambiente, entre otros parámetros físicos conocidos por influir en el proceso de germinación.

Los datos presentados para la tasa de germinación en la fase 2 (Tabla 10) suponen que los diferentes tratamientos aplicados no influyen significativamente en el proceso de germinación de las semillas de albahaca en condiciones de suelo real (p-Valor = 0,39, prueba ANOVA.). Aunque se observa la tasa de germinación más alta en el grupo "Blanco", con un promedio de 0,87, seguido por "Sonicado" y "Congelado" con tasas de germinación de 0,8 y 0,73, respectivamente. Por otro lado, el grupo "Liofilizado" exhibe la tasa de germinación más baja, con un promedio de 0,60. Vale la pena considerar que estas disparidades pueden ser atribuibles a diversos factores, como la calidad de las semillas, las características del sustrato y las condiciones ambientales. Además, el cambio del sustrato a Suelo real puede ser un factor relevante que influya en los resultados de germinación, si los comparamos con los resultados obtenidos en la primera fase.

4.3. Efectos de la fertilización en el crecimiento de las plantas

A continuación, se analizan los efectos de la fertilización aplicada en el crecimiento de los cultivos de *Ocimum basilicum*. Se estudiará el efecto en variables importantes como la altura de las plantas, la biomasa vegetal y otros indicadores que reflejan la salud y el vigor de la albahaca.

4.3.1. Análisis de las variables observadas durante el tiempo de experimento.

Análisis Fase 1:

Los resultados de analizar el crecimiento continuo de la longitud del tallo fueron los siguientes:



Imagen 18. Comparativa visual brote por tratamiento. Fase 1.

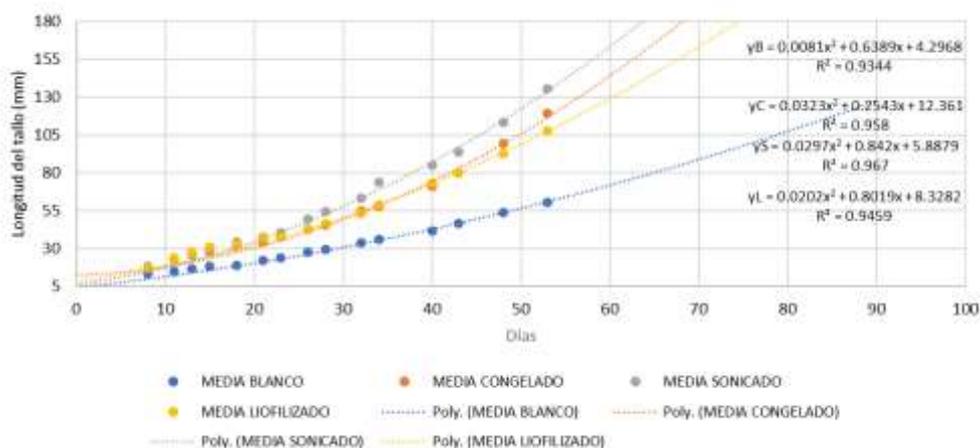


Imagen 19. Gráfico de tendencia de crecimiento de plantas. Fase 1.

Comparando los tratamientos, se observa que el tratamiento control (blanco) presenta el crecimiento más lento, después de los primeros 20 días ($y_B = 0.0081x^2 + 0.6389x + 4.2968$). entre los diferentes tratamientos, el sonicado se destaca por tener la mayor tasa de crecimiento durante los primeros 40 días ($y_S = 0.0297x^2 + 0.842x + 5.8879$). Además, la alta bondad del ajuste de las líneas de tendencia polinómicas denota que los modelos cuadráticos son apropiados para describir el crecimiento observado.

La gráfica indica que la aplicación de diferentes tipos de biofertilizantes promueve un mayor crecimiento en la longitud del tallo en comparación con el tratamiento de control. Además, entre los distintos tratamientos, el sonicado produce los mejores rendimientos, lo que demuestra que tiene un efecto fertilizante superior en términos generales.

Análisis Fase 2



Imagen 20. Comparativa visual brote por tratamiento. Fase 2.

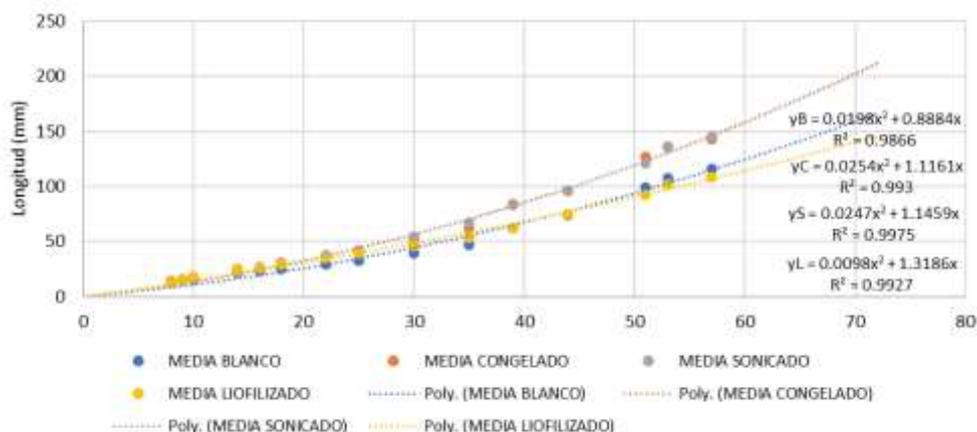


Imagen 21. Gráfico de tendencia de crecimiento de plantas. Fase 2.

Al comparar los diferentes tratamientos de la fase 2, mostraron un aumento notable en la velocidad de crecimiento, especialmente después de los primeros 20 días, se observó que el tratamiento control (blanco) tuvo un crecimiento más lento en comparación con otros tratamientos como la congelación y el sonicado aplicados al biofertilizante. Sin embargo, en comparación con el tratamiento de liofilización, el control mostró ser más eficiente y presentó un crecimiento algo más rápido.

El tratamiento de control mostró una tasa de crecimiento superior en la fase 2 ($y_B = 0.0198x^2 + 0.8884x$) a la observada en la fase 1 ($y_B = 0.0081x^2 + 0.6389x + 4.2968$), lo que indica una influencia del sustrato en la tasa de crecimiento, siendo el valor para este caso positiva a favor

de la fase 2. Los demás tratamientos presentaron tasas de crecimiento similares a las obtenidas en la fase 1; sin embargo, el fertilizante liofilizado no mostró tendencias de crecimiento consistentes, lo que indica que los efectos fertilizantes de este tratamiento están vinculados a las características del sustrato.

4.3.2. Variables al final del experimento.

En esta sección, se examinan las variables al final del experimento. Se analizarán aspectos como la altura de las plantas, el número y tamaño de las hojas, así como cualquier otra métrica relevante que pueda ofrecer insights sobre el desarrollo y la respuesta de *Ocimum basilicum* bajo las condiciones específicas del experimento.

4.3.2.1. Análisis de variables físicas.

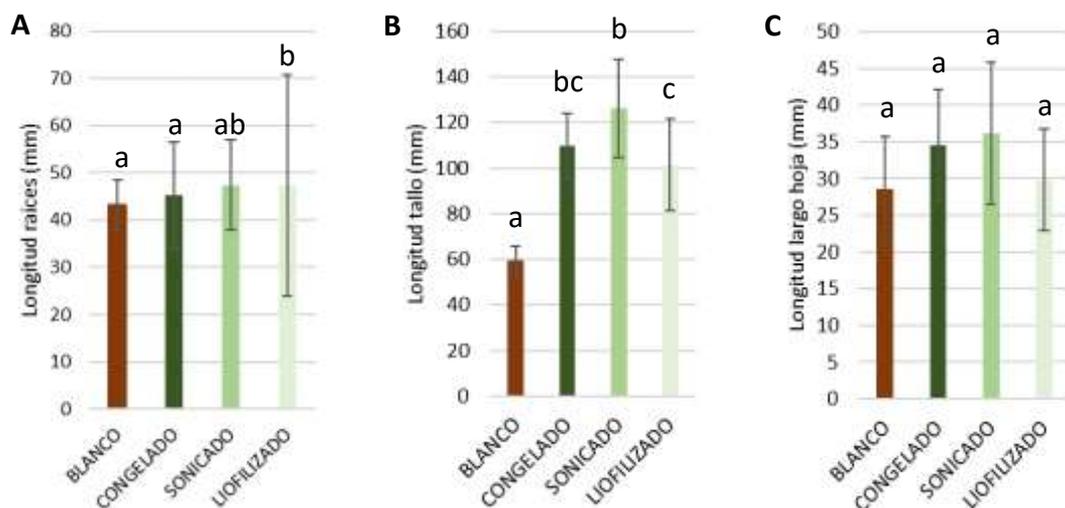
Resultados Fase 1:

En las siguientes imágenes se puede observar las diferencias visuales que presentaron los distintos tratamientos en la fase 1:



Imagen 22. Imágenes del cultivo de los diferentes tratamientos por replicas. Fase 1. Siguiendo esquema imagen 10.

A continuación se presentan los resultados y análisis de los datos físicos y agronómico obtenidos al final del periodo de observación, para determinar si hay diferencias significativas en los parámetros observados.



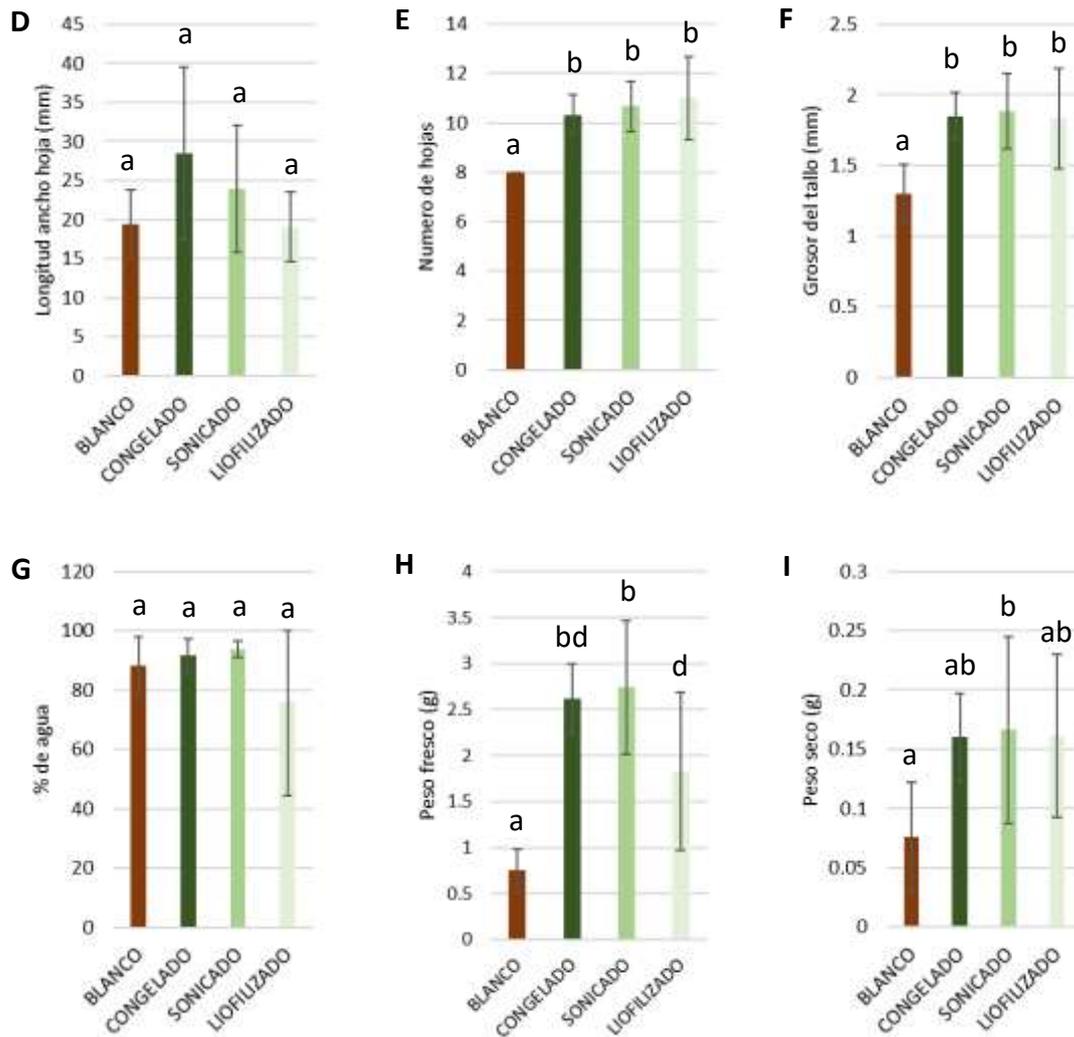


Imagen 23. Longitud raíces (A), longitud de tallo (B), longitud largo de hojas (C), longitud ancho de hojas (D), número de hojas (E), grosor de tallo (F), % de agua de las plantas (G), peso fresco (H) y peso seco (I) ($n = 24$) de plantas de albahaca cultivadas en SPHAGNUM con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey.

Los resultados presentados (imagen 23) reflejan el análisis de las variables relacionadas con el rendimiento del crecimiento de las plantas. De las nueve variables evaluadas, cinco muestran diferencias significativas para los diferentes biofertilizantes aplicados (longitud del tallo, número de hojas, grosor del tallo, peso fresco y peso seco), lo que sugiere que los diferentes tratamientos presentan mejoras importantes en comparación con el control. En particular, tres de estas cinco variables indican diferencias significativas a favor del tratamiento sonicado. Esto apunta a que el tratamiento sonicado es especialmente eficaz, proporcionando los mejores resultados en términos de rendimiento.

En términos de **longitud de raíces**, la media de los diferentes tratamientos varió entre 39 y 56 mm, sin diferencias significativas, excepto el liofilizado, debido a la variabilidad en los resultados. Esto supone que los biofertilizantes aplicados no mejoran significativamente el crecimiento de las raíces.

La **longitud del tallo** fue significativamente mayor en todos los tratamientos en comparación con el control, posiblemente debido a una mejor absorción de nutrientes o cambios en la estructura celular inducidos por los tratamientos. En particular, el tratamiento con sonicado mostró resultados destacados. Esto puede atribuirse a que el biofertilizante sonicado, con sus partículas más finas, facilita la mineralización del nitrógeno inorgánico y la disponibilidad de otros nutrientes presentes en la biomasa. Este proceso es crucial, ya que permite que los nutrientes sean absorbidos más eficientemente por las plantas (Jimenez et al., 2020; Suleiman et al., 2020). Sin embargo, la longitud y ancho de la hoja más alta no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

El **número de hojas** fue significativamente mayor en todos los tratamientos en comparación con el control, mostrando una mayor proliferación foliar bajo estas condiciones, probablemente debido a una mejor disponibilidad de nutrientes inducidos por los tratamientos.

El **grosor del tallo** también mostró un aumento significativo en los tratamientos Congelado, Sonicado y Liofilizado en comparación con el control, revelando que estos métodos pueden fortalecer la estructura del tallo, aumentando su capacidad para soportar un mayor crecimiento vegetativo. Aunque no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de agua en las plantas entre los tratamientos, el peso fresco y seco de las plantas fue notablemente afectado.

El control mostró un **peso fresco** significativamente menor, lo que señala que estos tratamientos promueven la absorción de agua y nutrientes del medio. El tratamiento sonicado presentó el mayor peso fresco, indicando un mayor crecimiento vegetativo bajo esta condición.

En términos de **peso seco**, el tratamiento sonicado mostró diferencias significativas en comparación con el control. Estos resultados sugieren que los tratamientos físicos, como la sonicación y la liofilización, pueden promover ciertos aspectos del crecimiento de las plantas, como el alargamiento del tallo y la proliferación foliar. Sin embargo, la liofilización puede ser menos eficiente en comparación con tratamientos como el congelado.

Resultados Fase 2:

En las siguientes imágenes se puede observar las diferencias visuales que presentaron los distintos tratamientos en la fase 2:



Imagen 24. Imágenes del cultivo de los diferentes tratamientos por replicas. Fase 2. Siguiendo esquema imagen 10.

A continuación se presentan los resultados y análisis de los datos físicos y agronómicos obtenidos al final del periodo de observación, para determinar si hay diferencias significativas en los parámetros observados.

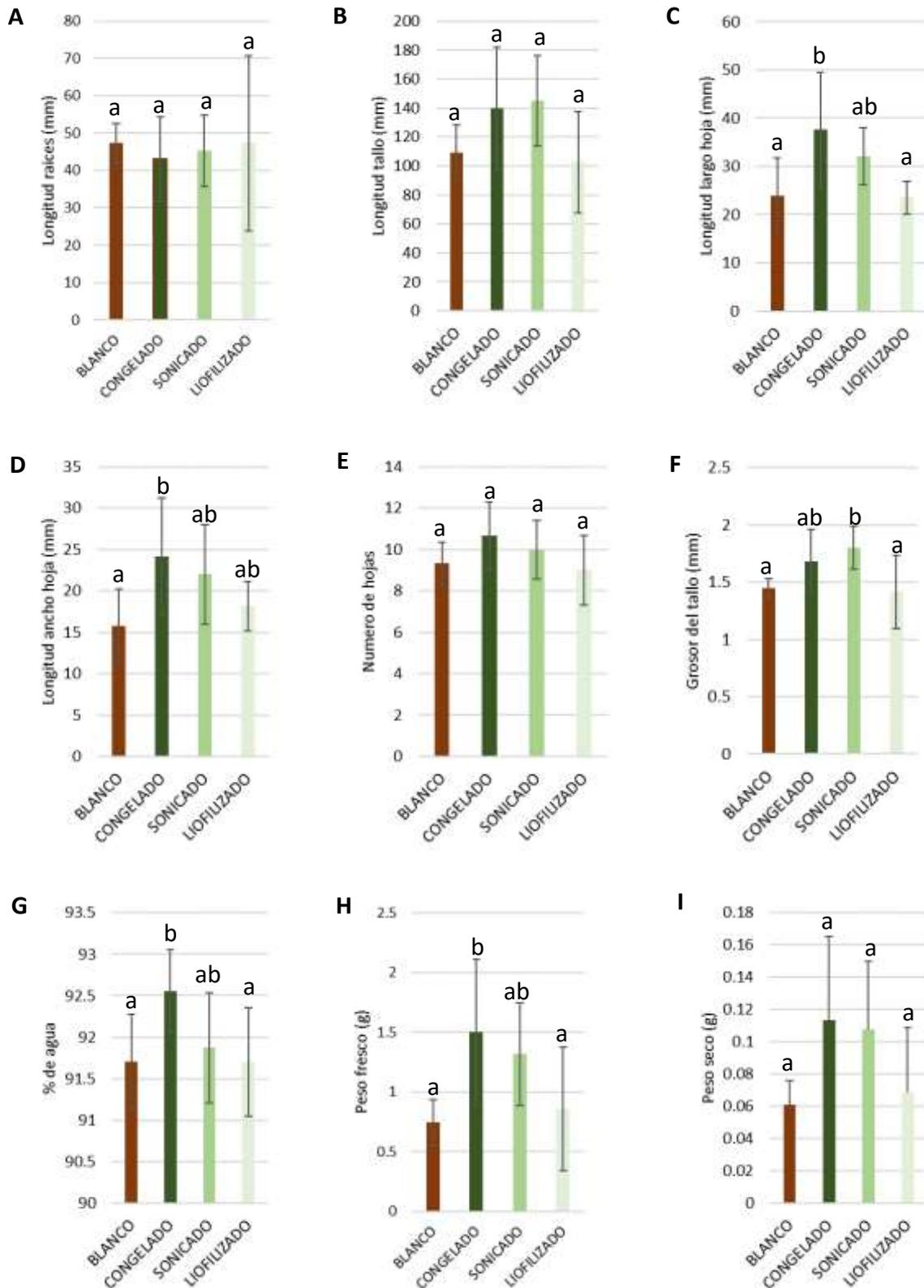


Imagen 25.. Longitud raíces (A), longitud de tallo (B), longitud largo de hojas (C), longitud ancho de hojas (D), número de hojas (E), grosor de tallo (F), % de agua de la planta (G), peso fresco (H) y peso seco (I) (n = 23) de plantas de albahaca cultivadas en Suelo con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey.

Los resultados presentados (Imagen 25) reflejan el análisis de las variables relacionadas con el rendimiento del crecimiento de las plantas. De las nueve variables evaluadas, cinco muestran diferencias significativas para los diferentes biofertilizantes aplicados (ancho y largo de las hojas, grosor del tallo, % de agua de las plantas y peso fresco), lo que muestra que los diferentes tratamientos presentan mejoras importantes en comparación con el control. En particular, tres de estas cinco variables indican diferencias significativas a favor del tratamiento congelado. Por lo tanto, se puede inferir que la aplicación de biofertilizantes congelado promueve un crecimiento más eficiente y robusto de las plantas en comparación con otros tratamientos y el control.

Por el contrario, en términos de **longitud de raíces y longitud del tallo**, los tratamientos no presentaron diferencias significativas. Esto indica que los diferentes biofertilizantes aplicados no generan mejoras notables en el crecimiento de las raíces y rendimiento vertical de las plantas.

Se observaron diferencias significativas en la **longitud y el ancho de la hoja** más alta entre los tratamientos, destacando el tratamiento congelado como el más efectivo.

El **número de hojas** no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el grupo de control. Esto sugiere que, en términos de cantidad de hojas producidas, los tratamientos no presentaron un impacto notable en comparación con las condiciones estándar del control experimental.

El **grosor del tallo** mostró un aumento significativo en el tratamiento Sonicado (10.85 mm) en comparación con el control (1.45 mm). Este hallazgo supone que el proceso de sonicación puede fortalecer la estructura del tallo, potenciando su capacidad para soportar un mayor crecimiento vegetativo de manera efectiva.

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de agua entre los tratamientos, y el **peso fresco** de las plantas. El grupo de control (Blanco) mostró un menor porcentaje de agua y peso fresco en comparación con el tratamiento de sonicado, lo que insinúa que este método promueve la absorción de agua y nutrientes del medio. Específicamente, el tratamiento sonicado exhibió el mayor peso fresco, indicando un incremento significativo en el crecimiento vegetativo bajo estas condiciones.

En términos de **peso seco**, los diferentes tratamientos no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo de control. Esto sugiere que, en cuanto a la masa seca de las plantas, los tratamientos no presentaron un efecto discernible que pudiera atribuirse a variables distintas a las condiciones estándar del control experimental.

4.3.2.2. Análisis de contenido de clorofila.

Resultados Fase 1:

En la fase 1 (cultivo en SPHAGNUM), se obtuvieron los siguientes resultados para el análisis de la clorofila (Imagen 25):

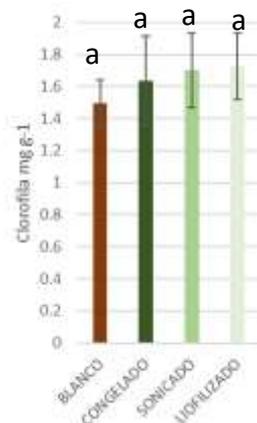


Imagen 26. Contenido de clorofila ($n = 12$) de plantas de albahaca cultivadas en SPHAGNUM con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey

Los datos de clorofila (Imagen 26) (mg Cl g^{-1}) el tratamiento "Blanco" mostró una media de 1.5 mg Cl g^{-1} de clorofila. Todos los tratamientos con biofertilizantes presentaron medias de clorofila mayores que el control, sugiriendo una mejora en la actividad fotosintética de las plantas, aunque estadísticamente no se observan diferencias significativas.

El grupo de control (tratamiento "Blanco") proporciona una referencia clave para evaluar si los demás tratamientos de biofertilizantes afectan los niveles de clorofila, por lo que se puede asumir que la aplicación de biofertilizantes mantiene la actividad fotosintética dentro de los rangos normales y esperados.

Resultados Fase 2:

En la fase 2 (cultivo en Suelo real), se obtuvieron los siguientes resultados para el análisis de la clorofila (Imagen 27):

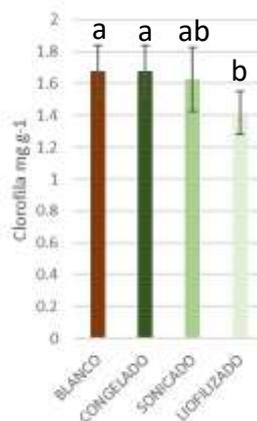


Imagen 27. Contenido de clorofila ($n = 24$) de plantas de albahaca cultivadas en Suelo con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error

corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey.

Los datos de clorofila (mg Cl g^{-1}) revelan variaciones significativas entre las plantas de albahaca tratadas con biofertilizantes cultivadas en suelo real. El tratamiento "Blanco" mostró una media de $1.7089 \text{ mg Cl g}^{-1}$ de clorofila, estableciendo un punto de comparación respecto a los efectos en la clorofila de los tratamientos de fertilización.

El tratamiento con biofertilizante congelado presentó una media de $1.7089 \text{ mg Cl g}^{-1}$ de clorofila, idéntica al control, lo que indica que el proceso de congelación no afecta significativamente los niveles de clorofila en las plantas. Por otro lado, el tratamiento con biofertilizante sonicado registró una media ligeramente inferior al control, con $1.6466 \text{ mg Cl g}^{-1}$ de clorofila. Aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa, revela que la sonicación podría tener un impacto levemente negativo en los niveles de clorofila, permitiendo, no obstante, que las plantas mantengan su actividad fotosintética sin alteraciones importantes.

En contraste, el tratamiento con biofertilizante liofilizado mostró una media de $1.4584 \text{ mg Cl g}^{-1}$ de clorofila, considerablemente menor que el control. Esta disminución sugiere que la liofilización no facilita la adecuada disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, lo cual podría resultar en una menor concentración de clorofila en las plantas y afectar negativamente su eficiencia fotosintética.

En resumen, los biofertilizantes congelados y sonicados mantienen los niveles de clorofila en las plantas de albahaca dentro de rangos normales, comparables al control. Estos tratamientos no afectan negativamente la actividad fotosintética de las plantas y pueden considerarse métodos viables para biofertilizar el sustrato. En contraste, el biofertilizante liofilizado mostró una reducción significativa en los niveles de clorofila, lo que podría afectar la eficiencia fotosintética de las plantas.

4.3.2.3. Análisis de contenido de nutrientes.

Resultados Fase 1:

Para evaluar el impacto del biofertilizante de microalgas en la composición nutricional de la albahaca en la fase 1, se realizaron análisis detallados de nitrógeno (N) y fósforo (P) en el tejido foliar. Los resultados de ANOVA revelaron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos para los contenidos de N y P, según los valores de p-valor obtenidos.

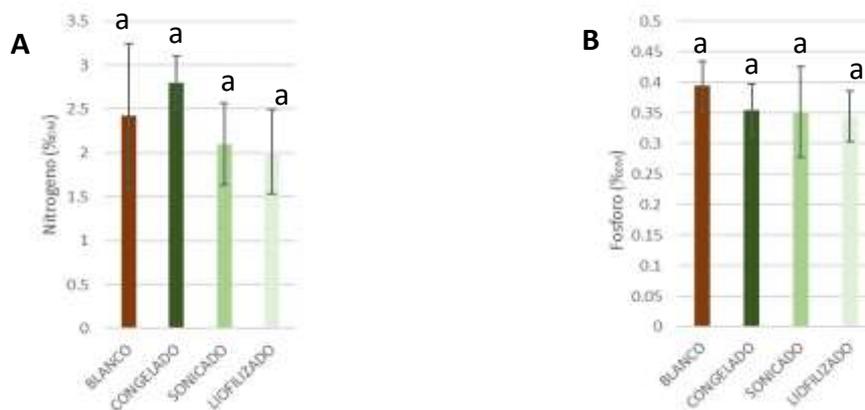


Imagen 28. Contenido de nitrógeno (A) y contenido de fósforo (B) ($n = 12$) de plantas de albahaca cultivadas en SPHAGNUM con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante

liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey.

El contenido promedio de nitrógeno en las hojas fue consistente entre los tratamientos: "Congelado" (2.80), "Blanco" (2.42), "Sonicado" (2.10) y "Liofilizado" (2.01). En cuanto al fósforo, los valores también mostraron uniformidad: "Blanco" (0.394), "Congelado" (0.354), "Sonicado" (0.352) y "Liofilizado" (0.344).

Se observó que el análisis de varianza no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para ambos nutrientes (Imagen 22). Esto muestra una absorción uniforme de nitrógeno y fósforo, independientemente del tipo de fertilización aplicada.

Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que destacan la estabilidad en la asimilación de nutrientes en cultivos bajo condiciones de biofertilización (Álvarez-González et al., 2022). Aunque no se encontraron diferencias significativas en los contenidos de N y P, futuras investigaciones podrían enfocarse en períodos de estudio más prolongados para evaluar la mineralización continua de la biomasa de microalgas y su efecto a largo plazo en la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

Los análisis de fósforo y nitrógeno en las hojas de albahaca no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, lo que sugiere que la biofertilización con microalgas podría ofrecer una alternativa viable y estable para la mejora nutricional de los cultivos, sin comprometer la acumulación de nutrientes esenciales.

Resultados Fase 2:

Para evaluar el impacto del biofertilizante de microalgas en la composición nutricional de la albahaca en la fase 2, se realizaron análisis de nitrógeno (N) y fósforo (P) en el tejido foliar. Los resultados de ANOVA revelaron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos para los contenidos de N, pero si para el P, según los valores de p-valor obtenidos.

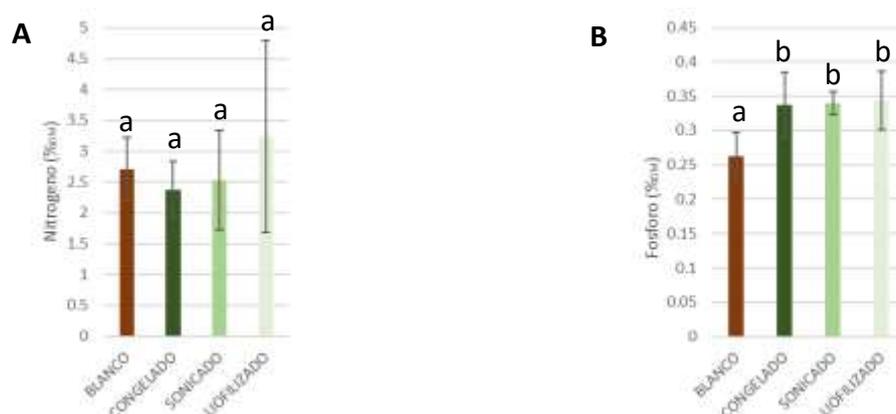


Imagen 29. Contenido de nitrógeno (A) y contenido de fósforo (B) ($n = 15$) de plantas de albahaca cultivadas en Suelo con diferentes tratamientos de fertilización: Blanco (Control), fertilizante congelado, fertilizante sonicado y fertilizante liofilizado. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.10$) según la prueba post hoc de Tukey.

En cuanto al contenido de nitrógeno, los resultados son los siguientes: el grupo de control (Blanco) presenta una media de 2.7074 mg N g⁻¹, el tratamiento con biofertilizante congelado tiene una media de 2.3733 mg N g⁻¹, el tratamiento sonicado muestra una media de 2.5301

mg N g⁻¹, y el tratamiento liofilizado presenta la media más alta con 3.2374 mg N g⁻¹. Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) no muestra diferencias significativas en el contenido de nitrógeno entre los diferentes tratamientos (p- Valor = 0.6140). Esto revela que, en general, los métodos de procesamiento del biofertilizante no afectan significativamente los niveles de nitrógeno en las plantas de albahaca en comparación con el grupo de control.

En contraste, el análisis del contenido de fósforo revela diferencias más marcadas. El grupo de control (Blanco) tiene una media de 0.2621 mg P g⁻¹, el tratamiento congelado muestra una media de 0.3370 mg P g⁻¹, el tratamiento sonicado tiene una media de 0.3395 mg P g⁻¹ y el tratamiento liofilizado presenta la media más alta con 0.3435 mg P g⁻¹. El análisis de varianza (ANOVA) muestra diferencias significativas entre los tratamientos (p- Valor = 0.0299), lo que indica que los tratamientos de biofertilizante afectan significativamente los niveles de fósforo en las plantas de albahaca.

Las comparaciones post hoc (Tukey HSD) revelan que las diferencias entre el grupo de control y los tratamientos congelado, sonicado y liofilizado son significativas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de congelado, sonicado y liofilizado.

En general, los resultados indican que mientras los diferentes tratamientos del biofertilizante no afectan significativamente los niveles de nitrógeno, sí tienen un impacto considerable en el contenido de fósforo en las plantas de albahaca. La falta de variación significativa en el contenido de nitrógeno muestra que la mineralización del nitrógeno orgánico a partir de los biofertilizantes es adecuada en todos los tratamientos. Por otro lado, el aumento significativo en los niveles de fósforo con los tratamientos procesados indica que estos métodos pueden mejorar la disponibilidad de fósforo para las plantas, posiblemente debido a una mejor liberación y absorción de este nutriente.

4.4. Comparación de cultivos. Fase 1 vs Fase 2

En esta sección, se comparan los resultados de los cultivos entre la Fase 1 y la Fase 2. Se evaluarán las diferencias en crecimiento y desarrollo de las plantas bajo los distintos tratamientos de biofertilizantes aplicados, considerando cómo las variaciones en las condiciones experimentales de cada fase pudieron influir en los resultados obtenidos.

Variables físicas

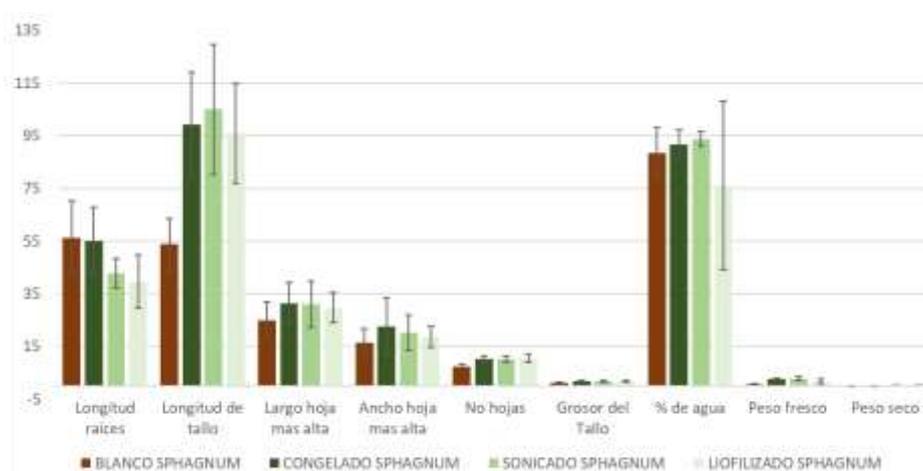


Imagen 30. Media y desviación estándar variables físicas. Fase 1.

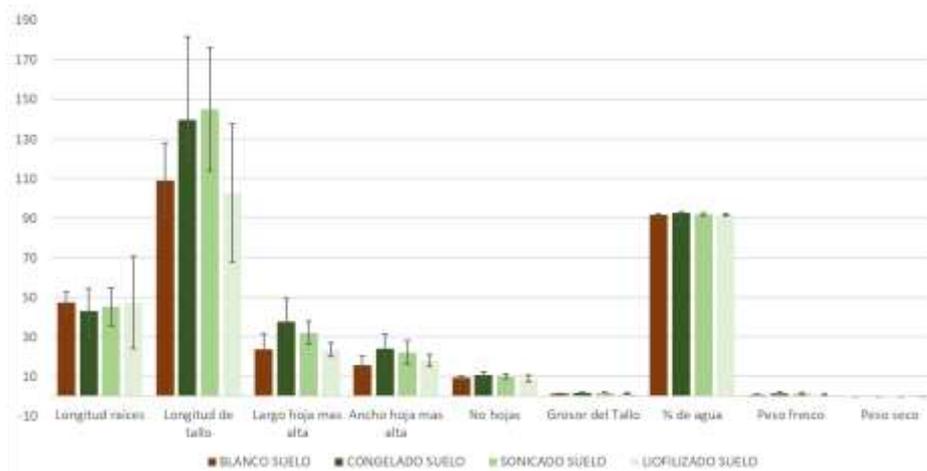


Imagen 31. Media y desviación estándar variables físicas. Fase 2.

	BLANCO		CONGELADO		SONICADO		LIOFILIZADO	
	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)
Longitud raíces	0.04	0.85	0.03	0.98	0.35	-0.33	0.30	-0.43
Longitud de tallo	6 e-5	-3.68	0.06	-1.23	0.13	-1.43	0.46	-0.24
Largo hoja más alta	0.15	0.14	0.30	-0.61	0.21	-0.14	0.03	1.32
Ancho hoja más alta	0.09	0.16	0.22	-0.18	0.33	-0.28	0.34	0.14
No hojas	0.005	-1.91	0.33	-0.32	0.19	0.23	0.03	1.08
Grosor del Tallo	0.06	-0.94	0.12	0.73	0.28	0.36	0.02	1.23
% de agua	0.20	-0.50	0.33	-0.26	0.09	0.90	0.13	-0.69
Peso fresco	0.48	0.03	0.002	2.20	0.002	2.38	0.02	1.36
Peso seco	0.24	0.43	0.06	1.04	0.08	0.93	0.01	1.64

Tabla 11. Fase 1 vs Fase2. Comparación de los diferentes tratamientos con respecto a los diferentes sustratos por variable física medida. p-Valor obtenido a través de la prueba t y d de cohen.

Analizando los datos de la fase 1 como punto de referencia, se puede evaluar como variar el sustrato afectan diversas variables de crecimiento de las plantas. Este análisis busca determinar si alguno de estos tratamientos de biofertilizante muestra potencial para ser considerado como bioestimulante. Se examina cómo cada tratamiento influye en aspectos como la longitud de las raíces, el largo del tallo, el número de hojas, entre otras variables relevantes.

El tratamiento Blanco, que actúa como control, muestra efectos significativos en varias variables. Por ejemplo, la longitud de las raíces y el largo del tallo exhiben diferencias notables, implicando un efecto considerable en estas características. Además, el número de hojas también muestra una diferencia clara en el Blanco de los diferentes sustratos. Otros aspectos como el ancho de la hoja más alta y el grosor del tallo muestran una relevancia menor pero significativa. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de agua, peso fresco ni peso seco. Esto apunta a que el tipo de suelo (SPHAGNUM para la fase 1 y Suelo real para la fase 2) podría estar influyendo en los resultados, posiblemente debido a la presencia o una mayor disponibilidad de nutrientes en el Suelo real en comparación con el suelo normalizado (SPHAGNUM).

Comparando los valores obtenidos en ambas fases, el tratamiento Congelado muestra un impacto significativo en la longitud de las raíces, sugiriendo que en la fase 2 puede promover un mayor crecimiento de raíces y una tendencia a afectar la longitud del tallo en comparación con la fase 1. Además, este tratamiento también revela significancia en el peso fresco, indicando un efecto positivo en la biomasa de las plantas. Sin embargo, otras variables como el largo de la hoja más alta, el número de hojas y el grosor del tallo no muestran diferencias significativas entre las fases analizadas. Al igual que el caso del blanco estas diferencias pueden atribuirse a disponibilidad de nutrientes en el sustrato.

El tratamiento Sonicado no muestra diferencias significativas en la mayoría de las variables, lo que indica que el proceso de sonicación del biofertilizante no produce cambios notables en el crecimiento de las plantas cuando cambiamos el sustrato, comparando los resultados de la fase 1 vs la fase 2. Sin embargo, se observan valores de d de cohen superiores a 0.8 que señala que el tamaño de efecto grande. Esto indica que el tratamiento Sonicado podría estar produciendo efectos consistentes en el crecimiento de las plantas, independientemente de los nutrientes suministrados por el sustrato, lo cual podría ser un indicio del potencial bioestimulante de este tratamiento. Esto puede deberse a que el biofertilizante sonicado, con sus partículas más finas, facilita la mineralización del nitrógeno inorgánico y la disponibilidad de otros nutrientes presentes en la biomasa.

El tratamiento Liofilizado, sin embargo, presenta impactos significativos en el largo de la hoja más alta ($p = 0.0360$), el número de hojas ($p = 0.0326$) y el grosor del tallo ($p = 0.0292$). Esto indica que la liofilización del biofertilizante mejora estas variables de crecimiento de manera significativa en comparación con la fase 1. Adicionalmente, el peso fresco ($p = 0.0198$) y el peso seco ($p = 0.0131$) también presentan mejoras significativas, lo que denota un aumento en la biomasa total de las plantas tratadas con biofertilizante liofilizado.

Clorofila

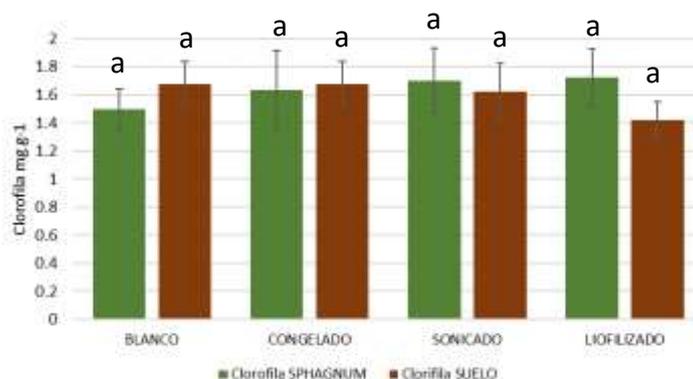


Imagen 32. Media y desviación estándar del clorofila. Fase 1 y Fase 2.

	BLANCO		CONGELADO		SONICADO		LIOFILIZADO	
	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)
Clorofila	0.11	-1.19	0.31	-0.18	0.35	0.34	0.03	1.75

Tabla 12. Comparación de los diferentes tratamientos con respecto a los diferentes sustratos por nutriente analizado. Fase 1 vs Fase 2. p -Valor obtenido a través de la prueba t y d de cohen.

El análisis estadístico de los niveles de clorofila entre dos fases de tratamiento (fase 1 y fase 2) para los diferentes métodos (blanco, congelado, sonicado, liofilizado) proporciona resultados para determinar si la capacidad fotosintética se mantiene dentro de un rango

normal. La comparación del tratamiento blanco entre las dos fases muestra un p-valor de 0.1046 y un d de Cohen de -1.1916, lo que indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en los niveles de clorofila, aunque el tamaño del efecto es grande y negativo, que señala un considerable aumento en los niveles de clorofila en la fase 2 respecto a la fase 1, que se puede atribuir al cambio de sustrato. El tratamiento congelado presenta un p-valor de 0.3143 y un d de Cohen de -0.1841, lo indica la ausencia de significancia estadística y un ligero aumento en los niveles de clorofila en la fase 2.

En cuanto al tratamiento sonicado, el p-valor es de 0.3598 y el d de Cohen es de 0.3430, mostrando igualmente una ausencia de diferencia significativa y una ligera tendencia al aumento en los niveles de clorofila en la fase 1. Por último, el tratamiento liofilizado tiene un p-valor de 0.0323 y un d de Cohen de 1.7501, lo que muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con un tamaño del efecto muy grande y positivo, indicando un aumento considerable en los niveles de clorofila en la fase 1 en comparación con la fase 2.

El análisis de los resultados respalda la hipótesis de que el suelo real aporta nutrientes que incrementan la actividad fotosintética, lo cual se refleja en los valores observados para el tratamiento blanco. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de clorofila entre las fases 1 y 2 para los tratamientos blanco, congelado y sonicado, los valores se mantienen dentro de los rangos normales establecidos por el tratamiento base en la fase 1. En general, estos resultados indican que, a excepción del tratamiento liofilizado, los demás tratamientos mantienen la actividad fotosintética dentro de los parámetros esperados, cumpliendo con los valores establecidos por el tratamiento base en la fase 1.

Nitrógeno y fósforo

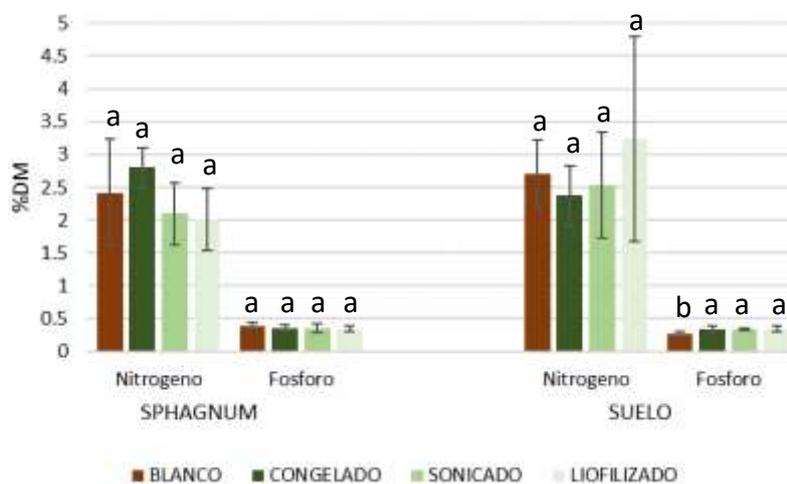


Imagen 33. Media y desviación estándar del Nitrógeno y Fosforo. Fase 1 y Fase 2.

	BLANCO		CONGELADO		SONICADO		LIOFILIZADO	
	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)	p-Valor	d (COHEN)
Nitrógeno	0.29	-0.42	0.11	1.11	0.22	-0.65	0.13	-1.06
Fosforo	0.003	-3.49	0.32	0.38	0.37	0.23	0.49	0.01

Tabla 13. Comparación de los diferentes tratamientos con respecto a los diferentes sustratos por nutriente analizado. Fase 1 vs Fase 2. p-Valor obtenido a través de la prueba t y d de cohen.

Analizando los datos de nitrógeno y fósforo en las plantas de la fase 1, podemos determinar cómo los tratamientos de biofertilizante (Congelado, Sonicado y Liofilizado) afectan estas variables de nutrientes.

Para el nitrógeno, el tratamiento Blanco no muestra una diferencia significativa en los niveles entre las fases del experimento, lo que sugiere una estabilidad en estos niveles independientemente del sustrato utilizado. En contraste, el tratamiento Congelado muestra una tendencia hacia la significancia, indicando que la congelación del biofertilizante podría potencialmente incrementar los niveles de nitrógeno en las plantas, aunque se requiere más evidencia para confirmar esta tendencia. Los tratamientos Sonicado y Liofilizado no muestran un efecto significativo en los niveles de nitrógeno en las diferentes fases y sustratos.

En cuanto al fósforo, el tratamiento Blanco muestra una diferencia altamente significativa entre las fases, lo que indica que el sustrato utilizado en la fase 2 afecta notablemente los niveles de fósforo en las plantas. En contraste, los tratamientos Congelado, Sonicado y Liofilizado no muestran diferencias significativas en los niveles de fósforo en comparación con el tratamiento Blanco en las diferentes fases.

Estos resultados muestran una estabilidad en las condiciones nutricionales a través de ambas fases del experimento, lo cual no solo asegura los nutrientes de las plantas, sino que también supone que puede existir cierto potencial bioestimulante de los diferentes tratamientos ya que se mantienen los niveles óptimos de nutrientes esenciales en las plantas.

Estos resultados indican una estabilidad en las condiciones nutricionales a lo largo de ambas fases del experimento, lo cual no solo asegura un suministro adecuado de nutrientes para las plantas, sino que también sugiere un posible efecto bioestimulante de los diferentes tratamientos, al mantener los niveles óptimos de nutrientes esenciales en las plantas.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudio de fin de máster investigó la capacidad bioestimulante y biofertilizante de la biomasa cultivada en agua residual urbana mediante diferentes tratamientos y utilizando dos tipos de sustratos distintos. A continuación, se presentan las conclusiones:

- En condiciones base de cultivo (SPHAGNUM), los tratamientos mostraron diferencias significativas en parámetros de crecimiento como longitud del tallo, grosor del tallo, número de hojas, peso fresco y seco del brote, en comparación con el tratamiento de control.
- En el cultivo en suelo normalizado (SPHAGNUM), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de biofertilizante y el control en términos de nutrientes, indicando una efectividad similar en la salud de las plantas.
- En condiciones base de cultivo (Fase 1), el tratamiento de sonicado mostró los mejores resultados, sugiriendo potencial bioestimulante independiente del sustrato. Sin embargo, se requieren más investigaciones para confirmar estos efectos.
- En el cultivo en suelo real (Fase 2), no hubo diferencias significativas en variables físicas como altura del tallo y número de hojas, pero sí en parámetros esenciales como longitud y ancho de hojas, grosor del tallo y peso fresco, destacando el impacto de los tratamientos en aspectos cruciales del desarrollo vegetal.
- Los análisis de nutrientes en el cultivo en suelo no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de biofertilizante y el control, lo que subraya la capacidad del biofertilizante para mantener las necesidades nutricionales de las plantas de manera efectiva.

Además, se compararon los resultados de distintas variables y fases del experimento:

- El tratamiento de congelado mostró efectos biofertilizantes similares a los observados en el tratamiento blanco, tanto en SPHAGNUM como en suelo natural, respaldando su eficacia en condiciones específicas de suelo.
- El tratamiento de sonicado no mostró diferencias significativas entre condiciones óptimas (SPHAGNUM) y suelo, indicando efectos bioestimulantes consistentes en el crecimiento de las plantas independientemente del sustrato.
- Finalmente, los análisis de nutrientes no revelaron diferencias significativas entre condiciones de cultivo en SPHAGNUM y suelo, sugiriendo un adecuado suministro nutricional en ambos casos.

5.1. Limitaciones y futuros estudios

Limitaciones del Estudio:

El estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse para una interpretación adecuada de los resultados. Primero, aunque se observaron diferencias significativas en diversas variables entre los tratamientos de biofertilizante y el control, la variabilidad inherente en las condiciones ambientales podría haber influido en los resultados. La falta de replicación a largo plazo y la variabilidad estacional influye en la consistencia de los efectos observados en el cultivo.

En el análisis entre diferentes fases, se encontraron diferencias no significativas en varios parámetros, pero con tamaños de efecto (d de Cohen) superiores a 0.8, indicativos de efectos

grandes. Es necesario realizar más réplicas y observaciones para evaluar con precisión la consistencia y significancia de estos efectos.

Además, se limitó la medición de nutrientes al nitrógeno y fósforo, y no se evaluaron otros parámetros del suelo que podrían haber influenciado los resultados, como la microbiota y la disponibilidad de nutrientes. Estos factores son cruciales para la eficacia del biofertilizante y deberían abordarse en futuras investigaciones.

Otra limitación radica en la falta de evaluación de otros parámetros de calidad del suelo que podrían haber influenciado los resultados, como la microbiota del suelo y la disponibilidad de nutrientes. Estos factores pueden tener un impacto significativo en la eficacia del biofertilizante y deberían considerarse en futuros estudios para una evaluación más integral de su efectividad.

Futuros Estudios:

Para avanzar en la comprensión de los efectos del biofertilizante, se recomienda realizar estudios adicionales con experimentos a largo plazo y análisis detallados de la dinámica de nutrientes. Esto permitirá entender mejor cómo el biofertilizante afecta la nutrición de las plantas en diferentes condiciones ambientales y etapas de desarrollo.

Explorar la interacción del biofertilizante con otros aspectos del suelo, como la microbiota y los nutrientes disponibles, es crucial para comprender completamente los mecanismos detrás de los efectos observados. Investigaciones en este sentido podrían proporcionar información valiosa sobre el impacto a largo plazo.

6. REFERENCIAS

- Franzoni, G. *et al.* (2022) *Biostimulants on crops: Their impact under abiotic stress conditions*, MDPI. Available at: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030189> (Accessed: 28 May 2024).
- Nair, K.P. (2019) 'Efficient plant nutrient management – the key factor in Sustainable Soil Management', *Intelligent Soil Management for Sustainable Agriculture*, pp. 5–7. doi:10.1007/978-3-030-15530-8_2.
- Pandey, P.K. and Pande, A. (2023) 'Eutrophication in Aquatic Ecosystem', *Aquatic Environment Management*, pp. 50–62. doi:10.1201/9781003313137-6.
- Kumar, L. and Bharadvaja, N. (2021) 'Algal-based wastewater treatment and Biorefinery', *Wastewater Treatment*, pp. 413–432. doi:10.1016/b978-0-12-821881-5.00020-9.
- Chisti, Y. (2013). Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology*, 167(3), 201-214. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.020>
- Razzak, S.A. *et al.* (2013) 'Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—a review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, pp. 622–653. doi:10.1016/j.rser.2013.05.063.
- Macedonio, F. and Drioli, E. (2022) 'Circular economy in selected wastewater treatment techniques', *Membrane Engineering in the Circular Economy*, pp. 101–122. doi:10.1016/b978-0-323-85253-1.00016-2.
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9
- Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., *et al.* (2016). Impact of biofertilizers on quality of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4310-4319. DOI: 10.1002/jsfa.7744
- Glick, B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, Article ID 963401. DOI: 10.6064/2012/963401
- Kumar, V., Singh, S., Prasad, S.M. (2019). Soil organic matter and soil quality. In *Soil Health and Climate Change* (pp. 95-118). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-9023-3_5

- Kumar, M., Agarwal, S., Singh, S. (2020). Microalgae as a potential source for biofertilizer. In *Agro-Environmental Sustainability: Managing Environmental Pollution* (pp. 175-186). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-15-1343-8_12
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686-702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Zhou, W. et al. (2011) 'Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production', *Bioresource Technology*, 102(13), pp. 6909–6919. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.038.
- Ángeles, R. et al. (2019) 'Potential of microalgae for wastewater treatment and its valorization into added value products', *Application of Microalgae in Wastewater Treatment*, pp. 281–315. doi:10.1007/978-3-030-13909-4_13.
- Bashan, Y. et al. (2013) 'Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013)', *Plant and Soil*, 378(1–2), pp. 1–33. doi:10.1007/s11104-013-1956-x.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., et al. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x
- Ghosh, A. *et al.* (2024) 'Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for Sustainable Agriculture', *Updates on Rhizobacteria*. doi:10.5772/intechopen.1004252.
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1-2), 3-41. DOI: 10.1007/s11104-014-2131-8
- Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., et al. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 701. DOI: 10.3389/fpls.2015.00701
- Glick, B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, Article ID 963401. DOI: 10.6064/2012/963401
- Rodríguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 38, 107377. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107377
- Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Yakhin, I.A., et al. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2049. DOI: 10.3389/fpls.2016.02049

- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586. doi:10.1023/A:1026037216893
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13, 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>.
- Saito, K., & Ezawa, T. (2016). Phosphorus metabolism and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, 197-216. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch12>
- Martini, F., Beghini, G., Zanin, L., Varanini, Z., Zamboni, A., & Ballottari, M. (2021). The potential use of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* as biostimulants on maize plants. *Algal Research*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102515>
- K.V., S., Behera, B., & P., B. (2020). Efficacy of microalgal extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. *Industrial Crops and Products*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112453>
- Kumar, S. (2012). Biopesticides: A Need for Food and Environmental Safety. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000e107>
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*, 77, 52–64. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2015.07.017>
- Swain, S. S., Paidasetty, S. K., & Padhy, R. N. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 90). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.030>
- Mol, I. K. (2020). Micro-algae as bio-pesticides for the development of sustainable agriculture. In *Wide Spectrum* (Vol. 8, Issue 6).
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y. K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317-1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Gupta, V., Ratha, S. K., Sood, A., Chaudhary, V., & Prasanna, R. (2013). New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges. *Algal Research*, 2(2), 79–97. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2013.01.006>
- Agricultura. Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/default.aspx>
- Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Slegers, P. M., Brentner, L. B., Roy, A., & Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 169–177. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2012.09.012>
- Samarakoon, K., & Jeon, Y. J. (2012). Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. *Food Research International*, 48(2), 948–960. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.03.013>

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
<https://doi.org/10.1263/JBB.101.87>
- Chen, Y. and Aviad, T. (2015) 'Effects of humic substances on plant growth', *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*, pp. 161–186.
doi:10.2136/1990.humicsubstances.c7.
- Wang, K., Brown, R. C., Homsy, S., Martinez, L., & Sidhu, S. S. (2013). Fast pyrolysis of microalgae remnants in a fluidized bed reactor for bio-oil and biochar production. *Bioresource Technology*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.016>
- Álvarez-González, A., Uggetti, E., Serrano, L., Gorchs, G., Ferrer, I., & Díez-Montero, R. (2022). Can microalgae grown in wastewater reduce the use of inorganic fertilizers? *Journal of Environmental Management*, 323, 116224.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116224>
- Zhang, Z., Xu, M., Fan, Y., Zhang, L., & Wang, H. (2024). Using microalgae to reduce the use of conventional fertilizers in hydroponics and soil-based cultivation. *Science of The Total Environment*, 912, 169424. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169424>
- Franzoni, G. *et al.* (2022a) 'Biostimulants on crops: Their impact under abiotic stress conditions', *Horticulturae*, 8(3), pp. 2–4. doi:10.3390/horticulturae8030189.
- du Jardin, P. (2015) 'Plant Biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation', *Scientia Horticulturae*, 196, pp. 9–10. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- Ministerio de la presidencia. (2017). Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. *Boletín Oficial Del Estado*, 296(I).
- Kant Bhatia, S. *et al.* (2022) 'Advances in algal biomass pretreatment and its valorisation into biochemical and bioenergy by the Microbial Processes', *Bioresource Technology*, 358, p. 127437. doi:10.1016/j.biortech.2022.127437.
- Su, Y. (2024) 'The drying technologies, physical properties and storage stability of edible microalgae powders', *Handbook of Food Powders*, pp. 557–574. doi:10.1016/b978-0-323-98820-9.00011-9.
- Regulation 2020/741/EU. (2020). Reglamento (UE) 2020/741 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de mayo de 2020, relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua. *Official Journal of the European Union*, 2019.
- Ministerio de la presidencia. (2017). Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. *Boletín Oficial Del Estado*, 296(I)
- Saito, K., & Ezawa, T. (2016). Phosphorus metabolism and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, 197-216.
doi:10.1002/9781118951446.ch12.
- Wong, C.K. and Teh, C. (2021) Impact of biofertilizers on horticultural crops, *Biofertilizers*, pp. 39–103. doi:10.1002/9781119724995.ch2.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells 102, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>

APHA-AWWS-WEF, 2012. STANDARD METHODS For the examination of water and wastewater. Published jointly by the American Water Works Association, the American Public Health Association, and the Water Environment Federation, Washington, DC.

Jimenez, R., Markou, G., Tayibi, S., Barakat, A., Chapsal, C., Monlau, F., 2020. Production of microalgal slow-release fertilizer by valorizing liquid agricultural digestate: growth experiments with tomatoes. *Appl. Sci.* 10, 3890. <https://doi.org/10.3390/app10113890>.

Suleiman, A.K.A., Lourenço, K.S., Clark, C., Luz, R.L., da Silva, G.H.R., Vet, L.E.M., Cantarella, H., Fernandes, T.V., Kuramae, E.E., 2020. From toilet to agriculture: fertilization with microalgal biomass from wastewater impacts the soil and rhizosphere active microbiomes, greenhouse gas emissions and plant growth. *Resour. Conserv. Recycl.* 161, 104924 <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.104924>.